

Aus dem Zentrum für Hygiene und Infektionsbiologie
der Philipps-Universität Marburg
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. H.-D. Klenk
Institut für Virologie
Direktor: Prof. Dr. H.-D. Klenk

**Audiometrisches Screening zur
Identifikation von Personen mit Zustand nach
Lassavirus-Infektion in Guinea, West Afrika**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin

Dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Paul Florian Rotter

aus Frankfurt am Main
Marburg, 2006

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
am 26. September 2005

Gedruckt mit Genehmigung der Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. Bernhard Maisch

Referent: PD Dr. Jan ter Meulen

Co-Referent: Prof. Dr. Roswitha Berger

2. Co-Referent: Prof. Dr. Wolfgang Garten

Tag der mündlichen Prüfung: 21. September 2006

<u>Inhaltsverzeichnis</u>	Seite
1 Zusammenfassung	1
2 Einleitung	3
2.1 Lassafieber: Definition und Geschichte	3
2.2 Epidemiologie	4
2.3 Biologie der Lassaviren	5
2.3.1 Struktur des Virions	5
2.3.2 Proteine des Lassavirus	6
2.3.3 Viraler Infektions- und Replikationszyklus	6
2.4 Lassavirusinfektion des Menschen	7
2.4.1 Übertragung	7
2.4.2 Pathogenese	7
2.4.3 Immunantwort	8
2.4.4 Klinik	9
2.4.5 Schwerhörigkeit	10
2.5 Diagnostik	12
2.6 Prävention	14
2.7 Therapie	14
2.8 Fragestellung und methodischer Ansatz	15
3 Patienten, Material und Methoden	17
3.1 Studiendesign	17
3.2 Untersuchungsgebiet und Bevölkerung	18
3.3 Patientenauswahl	19
3.4 Befragung der Probanden	20
3.5 Klinische Untersuchungen	21
3.5.1 Allgemeine klinische Untersuchung	21

3.5.2	Otoskopie	21
3.5.3	Audiometrie	21
3.6	Serologie	23
3.7	T-Zell-Proliferation	25
3.7.1	Lymphozytenisolation	27
3.7.2	Einfrieren der PBMC	28
3.7.3	Auftauen der PBMC	28
3.7.4	PBMC-Stimulation durch Antigene und Peptide	28
3.8	Zytokinmessung (IFN-gamma)	30
3.9	Statistische Methoden	32
4	Ergebnisse	33
4.1	Schwerhörigkeit	33
4.1.1	Patientenbefragung	36
4.2	Immunologische Marker einer Lassavirus-Infektion	36
4.2.1	Serologie	36
4.2.2	T-Zell-Proliferation	40
4.3	Zytokinmessung (IFN-gamma)	42
4.4	Deskriptive Epidemiologie	43
5	Diskussion	45
5.1	Wahl des Studiengebietes	45
5.2	Qualität und Ergebnisse des Audiometrischen Screenings	46
5.3	Serologie	47
5.4	T-Zell-Proliferation	49
5.5	Elispot Assays	50
5.6	Deskriptive Epidemiologie	50
5.7	Schwerhörigkeit und Marker einer Lassavirus-Infektion	51
5.8	Ausblick	60

6	Literaturverzeichnis	61
7	Anhang	73
7.1	Abkürzungsverzeichnis	73
7.2	Fragebogen	74
7.3	Abbildungen	76
7.4	Verzeichnis der Akademischen Lehrer	79
7.5	Danksagung	80

1 Zusammenfassung

Lassafieber ist ein in Westafrika fokal endemisch vorkommendes hämorrhagisches Fieber, an dem pro Jahr ca. 150.000 Menschen erkranken. Etwa 29% der Patienten entwickeln während der Rekonvaleszenz eine sensorineurale Schwerhörigkeit, die in 60% der Fälle nicht reversibel ist. Dies übersteigt die Inzidenz von sensorineuralen Hörschädigungen nach anderen postnatal erworbenen Infektionen, die in Westafrika ebenfalls weit verbreitet sind.

Bisher liegen in einem Niedrigprävalenzgebiet allerdings keine bevölkerungsbezogenen Daten darüber vor, welcher Anteil der sensorineuralen Schwerhörigkeit auf eine Lassavirus-Infektion zurückzuführen ist. Deshalb wurde in einer Kohorte von ansonsten gesunden Schwerhörigen in einem Lassa-endemischen Gebiet der Republik Guinea, Westafrika, die Häufigkeit von immunologischen Labormarkern einer abgelaufenen Lassavirus-Infektion, sowie ihre Korrelation mit dem Schweregrad der sensorineuralen Schwerhörigkeit untersucht. Des Weiteren wurde untersucht, ob der positive Vorhersagewert eines pathologischen Hörtestes ausreichend ist, um Personen mit Zustand nach Lassavirus-Infektion zu identifizieren.

Mit einer einfachen audiometrischen Untersuchung wurden in einem Gebiet mit ca. 4% Lassa-Antikörper-Prävalenz insgesamt 65 Personen mit einer Schallempfindungsschwerhörigkeit sowie 49 Kontrollpersonen mit normalem Hörvermögen identifiziert. Mittels indirekter Immunfluoreszenz wurden Lassavirus-spezifische Antikörper und mittels Lymphozyten-Proliferations-Assay eine Lassavirus-spezifische CD4 T-Zell-Antwort gemessen. In insgesamt 17% der Personen mit sensorineuraler Schwerhörigkeit waren Labormarker einer abgelaufenen Lassavirus-Infektion nachweisbar. Die weitere Untersuchung ergab eine statistisch signifikante Korrelation zwischen dem Schweregrad der sensorineuralen Schwerhörigkeit und Lassa-spezifischen Antikörpern ($p=0.019$) sowie der spezifischen T-Zell-Antwort ($p=0.007$). Damit ist erstmals gezeigt, dass auch in einem Gebiet mit relativ niedriger Lassavirus-Aktivität diese Infektion für einen erheblichen Anteil an der in der Bevölkerung

vorhandenen Schallempfindungsschwerhörigkeit mittleren bis höheren Schweregrades verantwortlich ist. Zudem deuten die Ergebnisse auf eine immunologische Genese der Ertaubung hin. Der positive Vorhersagewert einer audiometrischen Untersuchung ist allerdings zu gering, um Personen mit Zustand nach Lassavirus-Infektion in einem Niedrigprävalenzgebiet zu identifizieren.

2 Einleitung

2.1 Lassafieber: Definition und Geschichte

Lassafieber ist eine akute virale Erkrankung, die in einigen Ländern Westafrikas vorkommt. Ausgelöst wird die Krankheit durch das zur Familie der Arenaviren gehörende Lassavirus, dessen natürliches Reservoir die Nagertierspezies *Mastomys natalensis* darstellt. Menschen können durch das im Urin der Ratten ausgeschiedene Virus infiziert werden. Die Infektion kann inapparent verlaufen, eine grippale Symptomatik verursachen oder zu einem fulminanten hämorrhagischen Fieber mit Mortalitätsraten von über 15% führen.

Die Krankheit wurde erstmals in den 50er Jahren beschrieben. Das Virus wurde jedoch erst 1969 isoliert, nachdem amerikanische Missionsschwestern im Norden Nigerias an hämorrhagischem Fieber erkrankten (Frame et al., 1970). Benannt wurde es nach dem dortigen Hausa-Dorf Lassa, von dem die erste beschriebene Epidemie ausging.

Das Auftreten von Taubheit wurde erstmals im Jahre 1972 als Komplikation von Lassafieber beobachtet (Mertens, 1972; White, 1972). Bei einer klinischen Studie in Sierra Leone wurde 15 Jahre später über uni- und bilaterale Hörminderung berichtet, allerdings ohne audiometrische Diagnostik (McCormick et al., 1987a). Cummins et al. stellten 1990 im Rahmen einer prospektiven Studie in Sierra Leone erstmals audiometrische Daten von Patienten im Zusammenhang mit Lassavirus-Infektionen vor. Danach entwickelte sich eine akute sensorineurale Hörminderung in fast 30% der Patienten, die aufgrund einer Lassavirus-Infektion stationär behandelt wurden. Bei 2/3 dieser Patienten blieb eine dauerhafte Schädigung des Hörvermögens bestehen. Damit übersteigt die Inzidenz der Schallempfindungsschwerhörigkeit bei Patienten mit durchgemachter Lassavirus-Infektion bei weitem die Inzidenz von Hörschädigungen nach anderen postnatal erworbenen Infektionen (Cummins et al., 1990; Rybak, 1990).

Das Lassavirus wurde der Familie der Arenaviridae zugeordnet. Diese Viren zeichnen sich durch eine körnige, bzw. „sandige“ (lat. *arenosus*) Struktur in elektronenmikroskopischen Aufnahmen aus. Bereits 1933 wurde in St. Louis,

USA, das erste Arenavirus, das Lymphozytäre-Choriomeningitis-Virus (LCMV), als Auslöser einer Enzephalitis-Epidemie isoliert (Armstrong, 1934). Seitdem wurden insgesamt 20 Arenaviren isoliert, wovon fünf aus der „Alten Welt“ und 15 aus der „Neuen Welt“ stammen. Von den 7 humanpathogenen Arenaviren ist in Afrika lediglich das Lassavirus beheimatet. Aufgrund seiner Pathogenität sowie des Fehlens einer spezifischen Therapie und Vakzine, wird das Lassavirus in die höchste biologische Sicherheitsstufe (BSL4) eingeordnet.

2.2 Epidemiologie

Lassafieber kommt fokal endemisch in Westafrika von Guinea bis in den Osten Nigerias vor. McCormick et al. (1987b) gehen von jährlich 100.000-300.000 Infektionen aus, wovon etwa 30% klinisch apparent verlaufen. Die Letalität beträgt 1-5%, bei hospitalisierten Patienten 10-20%. Serologische Nachweise von Antikörpern gegen Lassavirus oder Lassa-ähnliche Viren wurden für die Länder Burkina Faso, Elfenbeinküste, Gambia, Ghana, Guinea, Liberia, Mali, Nigeria, Senegal, Sierra Leone (Monath, 1975) sowie für die Demokratische Republik Kongo erbracht (WHO, 2000).

Epidemiologische Seroprävalenzstudien zeigten eine Häufigkeit von Lassa-Antikörpern in der menschlichen Bevölkerung von 4-55% in Guinea (Lukashevich et al., 1993, ter Meulen et al., 1996), von 8-52% in Sierra Leone (McCormick et al., 1987b) und von 21% (Tomori et al., 1988) in Nigeria. Eine in Sierra Leone durchgeführte prospektive Seroprävalenzstudie zeigte, dass ca. 6% der empfänglichen Personen pro Jahr serokonvertieren, aber ungefähr ebensoviel serorevertieren (McCormick et al., 1987b). Zur Häufigkeit und Symptomatik von Reinfektionen liegen keine kontrollierten Studien vor. Es wird angenommen, dass diese häufig erfolgen und zumeist asymptomatisch verlaufen.

Es konnte gezeigt werden, dass Lassavirus-Infektionen beim Erwachsenen in Endemiegebieten Sierra Leones für 10–16% aller Krankenhausaufnahmen und etwa 30% der stationären Todesfälle verantwortlich sind (McCormick et al., 1987a). Etwa 29% aller stationären Patienten mit einer Lassavirus-Infektion

entwickeln eine akute Hörminderung auf einem oder beiden Ohren, die in 2/3 der Fälle irreversibel ist (Cummins et al., 1990).

Die Zahl der hospitalisierten Patienten nimmt während der Trockenzeit von Februar bis Mai zu, die Krankheit ist aber das ganze Jahr über präsent. Verantwortlich hierfür ist die saisonale Aktivität der Nager, der vermehrte Kontakt zwischen Mensch und Tier während der Erntezeit, sowie die erhöhte Beständigkeit virushaltiger Partikel während der trockenen Monate (McCormick et al., 1987b; Monath et al., 1974; Stephenson et al., 1984). Die Durchseuchung von *Mastomys natalensis* in endemischen Gebieten liegt bei 5-30% (Demby und Bausch, 2001; ter Meulen, unveröffentlicht).

Lassa-Fieber tritt in Regionen mit ansonsten stabiler Endemie immer wieder mit fulminanten Verläufen epidemisch auf, meist in Krankenhäusern, bedingt durch die lokal schlechten Hygieneverhältnisse, wie Wiederverwendung von Einmal-Kanülen etc. Der letzte große Ausbruch mit 823 Erkrankten einschließlich 153 Verstorbenen ereignete sich zwischen Januar 1996 und April 1997 in Sierra Leone (WHO, 2000). Seit 2001 wurden etliche kleinere Lassa-Fiebersausbrüche berichtet, unter anderem auch unter Soldaten der in Sierra Leone und Liberia stationierten UN-Friedenstruppen (ter Meulen 2001).

2.3 Biologie der Lassaviren

2.3.1 Struktur des Virions

Lassavirus-Partikel sind lipidumhüllte Partikel mit einem Durchmesser von 60-200nm. Die in elektronenmikroskopischen Aufnahmen sichtbaren körnigen Strukturen repräsentieren Ribosomen, die von der Wirtszelle aufgenommen werden. Auf der Oberfläche des Virions befinden sich, gebildet durch Tetramere der viralen Glykoproteine GP-1 und GP-2, so genannte „Spikes“. Das Genom besteht aus zwei Einzelstrang-RNA-Segmenten mit einer genetischen „ambisense“ Kodierung. Das S- (small) Segment mit etwa 3500 Nukleotiden beherbergt 2 Gene, die für drei Genprodukte kodieren: das Nukleoprotein (NP) und die Glykoproteine der Hülle (GP-1/ GP-2), die nach posttranslationaler Prozessierung aus dem precursor Protein (GP-C) gebildet werden. Das L-

(large) Segment besteht aus etwa 7200 Nukleotiden und beherbergt 2 Gene, die für die virale Polymerase (L-Protein) und das Z-Protein kodieren. Die in positiver Orientierung angeordneten Leserahmen für das GP-C und Z-Protein werden vermutlich über den Zwischenschritt einer antigenomischen RNA translatiert, während die in negativer Orientierung liegenden Leserahmen für NP und die virale Polymerase direkt über eine dem Genom komplementäre mRNA translatiert werden (Buchmeier et al., 2001).

2.3.2 Proteine des Lassavirus

NP stellt das mengenmäßig häufigste Strukturprotein des Arenavirus-Partikels dar. Bei einer Größe von etwa 570 Aminosäuren ist sein apparentes Molekulargewicht ungefähr 60kDa. Der Proteinvorläufer GP-C mit einem Molekulargewicht von 76kDa wird posttranslational in das periphere GP-1 und das membranständige GP-2 gespalten. Bei reifen Viruspartikeln befindet sich GP-1 als Tetramer auf der Oberfläche und steht mit dem membranständigen Tetramer aus GP-2 über ionische Wechselwirkungen in Verbindung.

Das kleinste bekannte Arenavirus-Protein mit einem apparenten Molekulargewicht von 11kDa stellt das Z-Protein dar. Salvato et al. zeigten 1989 für LCMV experimentell eine Ring-Struktur mit zinkbindender Aktivität. Vermutlich hat das Z-Protein regulatorische Aufgaben, dessen genaue Rolle im viralen Replikationszyklus noch nicht geklärt ist.

Das mit 250kDa größte Lassavirus-Protein stellt die RNA-abhängige RNA-Polymerase (L-Protein) dar, welche Bestandteil des Nukleokapsids ist (Buchmeier et al., 2001).

2.3.3 Viraler Infektions- und Replikationszyklus

Nach Bindung an den zellulären Rezeptor α -Dystroglykan werden die Viren über große, endozytotische Vesikel aufgenommen. In diesen erfolgt bei azidem pH eine durch GP-2 vermittelte Fusion der viralen Membran mit der Endosomenmembran, wodurch die RNA, Nukleoproteine und die assoziierte virale RNA-Polymerase ins Zytoplasma gelangen. Dort erfolgen Transkription und Replikation, sowie die Translation der viralen Proteine an

membrangebundenen Ribosomen. Der Glykoproteinvorläufer wird ins endoplasmatische Retikulum transloziert, dort in GP-1 und GP-2 gespalten und über den Golgi-Apparat an die Zelloberfläche transportiert. Hier findet der Zusammenbau neuer viraler Partikel statt und infektiöses Virus wird freigesetzt (Buchmeier et al., 2001).

2.4 Lassavirusinfektion des Menschen

2.4.1 Übertragung

Die Übertragung des Virus von Nagern auf den Mensch erfolgt über direkten oder indirekten Kontakt mit den Tieren bzw. ihren Exkrementen, welche nachts auf offen gelagerten Lebensmittelvorräten abgesetzt werden. Die hauptsächliche Übertragung erfolgt vermutlich durch Einatmen von Staubpartikel, an die virushaltiger Rattenurin angetrocknet ist. Einen großen Risikofaktor für direkte Übertragung stellen das Fangen, die Zubereitung und der Verzehr der Tiere dar (ter Meulen et al., 1996). Hierbei kann das Virus durch direkten Kontakt mit Wunden oder Schleimhaut auf den Menschen übertragen werden. Eine weitere Ursache direkter Übertragung stellt der enge Kontakt mit Sekret oder Blut infizierter Patienten dar. Dies geschieht häufig im Krankenhaus, wenn die Regeln des „barrier nursing“ nicht eingehalten werden, seltener auch im Haushalt (Fisher-Hoch et al., 1995). Auch Geschlechtsverkehr bis zu Monaten nach einer Lassafieber-Erkrankung wird als möglicher Übertragungsweg angenommen (Bausch et al., 2000).

2.4.2 Pathogenese

Die Pathogenese des Lassafiebers ist nicht vollends geklärt und vermutlich weniger auf direkte Schädigung der Organe durch Virusreplikation als auf indirekte Mechanismen zurückzuführen. Durch Infektion von Makrophagen und dendritischen Zellen in der Haut, Mukosa oder den Alveolen gelangt Virus über das periphere Kapillarsystem in das lymphatische System und den Blutkreislauf. Die wenig zytopathische Infektion der Wirtszellen erfolgt über das zelluläre Matrixprotein α -Dystroglycan, das sich auf dendritischen Zellen, aber auch auf etlichen Zellen anderer Organe befindet (Cao et al., 1998). Lassavirus

kann deshalb aus den meisten Organen isoliert werden mit besonders hohen Titern in Leber, Milz und Nebenniere. Der Schweregrad der Krankheit korreliert mit der Virämie (Johnson et al., 1987; McCormick and Fisher-Hoch, 2002), allerdings sind die histopathologischen Befunde der virusvermittelten Gewebsschädigung relativ diskret und erklären nicht Organversagen und Tod (Walker et al., 1982). Ein Teil der Organschädigung ist durch das sog. „plasma-leakage“ bedingt, welches auf virus- oder zytokinvermittelte Schädigung des Endothels zurückzuführen ist und zu Hypovolämie und Hypoxie führt. Biochemische Defekte infizierter Zellen und abnorme Funktion infizierter Immunzellen (Zytokine, andere Mediatoren etc.) werden als weitere Faktoren der Pathogenese diskutiert. Die beobachtete Lymphopenie wird möglicherweise durch B-Zell-Destruktion hervorgerufen (McCormick and Fisher-Hoch, 2002), während T-Zellen nicht durch Lassa-virus lysiert werden (Lukashevich et al., 1999). Die Infektion von dendritischen Zellen führt zu deren herabgesetzter Aktivierbarkeit und somit transienter Immunsuppression (Baize et al., 2004; Pannetier et al., 2004).

2.4.3 Immunantwort

Die Immunantwort gegen das Lassa-virus unterscheidet sich von der Immunantwort gegen andere virale Erreger. Antikörper werden verzögert gebildet, so dass in der Hälfte der Patienten mit fulminantem Verlauf keine Antikörper nachweisbar sind. In der ersten Woche nach Eintritt der Symptome sind ca. 50%, in der zweiten Woche ca. 90% der Patienten IgM positiv. Diese und die im Folgenden gebildeten IgG-Antikörper sind im Wesentlichen gegen das Nukleoprotein im Inneren des Viruspartikels gerichtet, so dass sie das Virus nicht neutralisieren können. Der Abfall der Virämie in der zweiten oder dritten Woche wird daher auf die T-Zell-Antwort zurückgeführt, welche allerdings bisher in Lassa-fieber-Patienten noch nicht untersucht wurde. Neutralisierende IgG-Antikörper, welche gegen die viralen Glykoproteine gerichtet sind, können in 60-70% der Patienten ca. 4-6 Monate nach der Infektion nachgewiesen werden (Tomori et al., 1988). Diese haben nur geringe Titer, könnten jedoch eine Rolle beim Schutz vor Reinfektionen spielen (ter Meulen 1999). Lassa-

spezifische IgM-Antikörper sind bis ca. 18 Monate nach akuter Infektion nachweisbar, IgG-Antikörper über viele Jahre (Niklasson et al., 1984), allerdings serorevertieren ca. 6% der Antikörper-positiven Personen jährlich (McCormick et al., 1987b).

Die Immunisierung von Affen oder Meerschweinchen mit experimentellen Impfstoffen zeigte, dass auch diese zumeist keine oder nur niedrigtitrige neutralisierende Antikörper bilden und dass die Immunität durch Transfer von Lymphozyten, nicht jedoch von Serum, auf naive Tiere übertragen werden kann (Fischer-Hoch und McCormick, 2001, 2004; Geisbert et al., 2005; Jahrling, 1985a). Eine starke CD4 T-Zell-Antwort gegen die Glykoproteine und das Nukleoprotein konnte in Probanden aus endemischen Gebieten in prospektiven Studien auch drei Jahre nach Seroreversion gezeigt werden (ter Meulen et al., 2000, 2004).

2.4.4 Klinik

Das klinische Bild einer Lassavirus-Infektion ist sehr variabel und unterscheidet sich vor allem im Anfangsstadium kaum von fieberhaften Erkrankungen anderer Ursache (Bausch et al., 2001). Es geht mit Verläufen unterschiedlicher Ausprägung einher, etwa 70% verlaufen subklinisch. Nach einer Inkubationszeit von 7-18 Tagen beginnt die Erkrankung mit grippeähnlichen Symptomen, wie allgemeines Krankheitsgefühl, Fieber, Schwäche und Myalgie. Innerhalb des dritten bis vierten Krankheitstages entwickeln 2/3 der Patienten trockenen, nicht produktiven Husten, begleitet von Halsschmerzen. Über die Hälfte der Erkrankten klagt über Schmerzen der großen Gelenke und der lumbalen Rückenpartien. Das anhaltende Fieber erreicht Spitzen von 39-41°C in den frühen Morgen- und Abendstunden. Die Mehrzahl der Patienten leidet unter starken, meist frontal lokalisierte Kopfschmerzen. Viele Patienten entwickeln gastrointestinale Beschwerden wie Bauchschmerzen, Übelkeit, Erbrechen und Durchfall. Weiterhin treten typischerweise retrosternale Schmerzen, Konjunktivitis und Pharyngitis auf, die in 50% exsudativ verläuft. Hierbei finden sich Beläge v.a. auf den Tonsillen, was zu erheblichen Schluckbeschwerden führt. Bei der Hälfte der Patienten entwickelt sich eine schmerzlose

generalisierte Lymphadenopathie. Atem- und Pulsfrequenz sind entsprechend der erhöhten Körpertemperatur gesteigert. Der systolische Blutdruck liegt im Mittel bei 103mmHg. Bei mildem Verlauf setzt nach etwa 8-10 Tagen Besserung ein, bei schwerem Verlauf (etwa 15% der hospitalisierten Patienten) verschlechtert sich der Zustand rapide. Die Kranken entwickeln typische Hals- und Gesichtsödeme, in etwa 20% finden sich Schleimhautblutungen. Diese können im gastrointestinalen, urogenitalen und vaginalen Bereich auftreten, sowie Blutungen aus Nase und Zahnfleisch hervorrufen. Infolge einer interstitiellen Pneumonie sowie eines Larynxödems kommt es zu einer respiratorischen Insuffizienz, gefolgt von zentraler Zyanose. Einige Patienten weisen Zeichen einer Enzephalopathie auf (Verwirrung, Tremor, generalisierte Krampfanfälle, Koma). Der Tod tritt unter der Symptomatik eines „acute respiratory distress syndrom“ (ARDS) und irreversiblen hypovolämischen Schock ein (McCormick et al. 1987a).

Über 70% der Patienten weisen ein abnormales EKG auf, häufig handelt es sich um Veränderungen der T-Welle (Unspezifische ST-Segmente, ST-Hebungen) und eine Niedervoltage (Cummins et al. 1989a). Häufig treten in der frühen Rekonvaleszenz Pleuraerguss, Pleurareiben, Perikarditis mit Perikarderguss und Aszites auf. Die Genesung ist durch Phasen von Schwäche und Müdigkeit oft verlängert.

Für Schwangere stellt eine Lassafieber-Infektion ein erhöhtes Letalitätsrisiko (21 %) dar, besonders im letzten Trimenon (30%). Die fetale Letalität beträgt über 85%. Bei Kindern liegt die Sterblichkeit zwischen 12 und 27% (McCormick und Fisher-Hoch 2002).

2.4.5 Schwerhörigkeit

Cummins et al. (1990) führten erstmals audiometrische Untersuchungen bei Lassafieber-Patienten durch.

Es zeigte sich, dass fast 30% der stationären Patienten während der Rekonvaleszenz eine akute sensorineurale Hörminderung unterschiedlicher Stärke entwickelten. In etwa 50% war eine beidseitig Störung zu beobachten. Die Schwerhörigkeit trat ungefähr 5 bis 12 Tage nach Rückgang des Fiebers

auf. Der Schweregrad sowie das Auftreten der Hörminderung waren unabhängig vom Schweregrad der Lassafieber-Erkrankung. In ca. 70% war die Hörstörung symptomatisch, mit plötzlichem Beginn bei einigen Patienten, bis hin zu einer protrahierten Entwicklung über mehreren Stunden bei anderen Patienten. Die mittlere Hörschwelle der betroffenen Ohren (Mittelwert der getesteten Frequenzen von 0,5 – 4kHz) lag bei 55dBHL. Das Auftreten von Tinnitus war bei Lassafieber-Patienten, die eine Taubheit entwickelten, häufiger (ca. 80%) als bei Nicht-Ertauben (ca. 40%). Schwindel konnte aufgrund von Sprachbarrieren nicht genau evaluiert werden. Nystagmus, Ataxie sowie klinische Zeichen einer Enzephalopathie waren nicht mit dem Auftreten der Schwerhörigkeit assoziiert. Antikörper gegen das Lassavirus waren immer vor Beginn der Schwerhörigkeit nachweisbar. Zwischen ertaubten und nicht-ertaubten Patienten fanden sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Merkmale Alter, Geschlecht, Hämatokrit bei stationärer Aufnahme, höchstem GOT-Wert, sowie erhaltener antiviraler Therapie. In etwa 60% der Fälle bildete sich die Schwerhörigkeit nicht zurück, bei unilateralem Defizit in 1/3 und bei bilateralem Defizit in 2/3 der Fälle.

In einer zweiten Studie zeigten Cummins et al. (1990), dass bei Lassa-Antikörper positiven Personen die Prävalenz von plötzlich aufgetretener sensorineuraler Schwerhörigkeit 17,6% betrug. Die mittlere Hörschwelle betrug 43,7dBHL, eine unilaterale Störung zeigten 2/3, eine bilaterale Störung zeigten 1/3 der Patienten.

In einer dritten Studie untersuchten Cummins et al. (1990) 32 Personen aus einem Lassa-Endemiegebiet in Sierra Leone, die eine plötzlich aufgetretene sensorineurale Schwerhörigkeit im Zusammenhang mit einer fieberhaften Erkrankung erlitten hatten. Bei diesen Patienten konnten in 81% Lassavirus spezifische Antikörper nachgewiesen werden, im Gegensatz zu 19% Seropositivität in der Kontrollgruppe.

Cummins et al. (1990) postulieren, dass die Immunantwort gegen das Lassavirus für das Auftreten der Schwerhörigkeit bedeutender ist, als der klinische Schweregrad des Lassafiebers aufgrund folgender Ergebnisse:

(1) Die GOT-Werte waren nicht signifikant erhöht bei Patienten, die ertaubten. (2) Totale bilaterale Taubheit trat bei Patienten mit Lassafieber geringer klinischer Ausprägung auf. (3) Antivirale Therapie verminderte weder das Risiko, noch die Stärke der Hörschädigung. (4) Das Auftreten der Taubheit lag in der Rekonvaleszenz, nachdem die Serokonversion stattgefunden hatte, und nicht in der akuten Krankheitsphase.

2.5 Diagnostik

Die klinische Diagnostik gestaltet sich aufgrund der relativ unspezifischen Symptome schwierig. Lassafieber ist nur schwer von anderen fieberhaften Erkrankungen wie Malaria, Sepsis, Gelbfieber oder anderen schweren systemischen Infektionserkrankungen zu unterscheiden (WHO, 2000). Bei einem Patienten aus einem endemischen Gebiet besitzen Fieber, Pharyngitis, retrosternaler Schmerz und Proteinurie bei gemeinsamem Auftreten den besten Vorhersagewert (0,81) für Lassafieber (McCormick et al. 1987a). Typische Laborveränderungen sind ein erhöhtes GOT (McCormick et al., 1986), sowie eine Lympho- und Thrombozytopenie (Fisher-Hoch et al., 1988). Die Thrombozytopenie ist mit einem Serum-Inhibitor der Plättchenfunktion, sowie dem Auftreten von Hämorrhagien und der Schwere der Lassa-Erkrankung assoziiert (Cummins et al., 1989b).

Die letztendliche Bestätigung bei Verdacht einer Lassavirus-Infektion setzt spezielle Laborverfahren voraus. Hierzu stehen neben der Virusisolation die Bestimmung virusspezifischer Immunglobuline (IgG, IgM) und die Detektion von RNA mittels RT-PCR zur Verfügung.

Virusisolation kann aus Serum, Körperflüssigkeiten oder Gewebe in Zellkulturen erfolgen, muss aber in einem Hochsicherheitslabor der Stufe 4 (BSL4-Labor) stattfinden (Johnson et al., 1987), welche in Endemiegebieten nicht vorhanden sind. Virus wurde aus Urin, Halsabstrichen, Muttermilch, Liquor cerebrospinalis, Pleura- und Perikardtranssudat sowie Autopsiematerial gewonnen (McCormick und Fisher-Hoch, 2002). Im Urin konnte das Virus in einigen Fällen noch ein bis zwei Monate nach der akuten Krankheitsphase isoliert werden (McCormick et

al. 1987a). Auch aus Samen konnte bis zu 6 Wochen nach akuter Krankheitsphase Virus isoliert werden (Frame et al., 1970). Schneller und genauso sensitiv wie die Virusisolation ist der Nachweis von RNA mittels Polymerasekettenreaktion (RT/PCR), die auch an inaktiviertem Patientenmaterial durchgeführt werden kann (Demby et al., 1994, Drosten et al., 2003).

Der Nachweis einer akuten Lassavirus-Infektion mittels serologischer Tests ist schwierig, da Patienten mit schweren Verläufen häufig keine Antikörper bilden und der Nachweis von Antigen (Virusprotein) sehr insensitiv ist. Zudem sind diese Tests kommerziell nicht erhältlich und nur einige wenige Zentren mit Hochsicherheitslaboren sind weltweit in der Lage Lassainfektionen zu diagnostizieren (z.B. das Bernhard-Nocht-Institut, Hamburg oder das Centers for Disease Control, Atlanta, USA). Das CDC ist derzeit das einzige Labor, welches einen ELISA zur Antigendetektion vorhält, parallel wird jedoch auch immer die PCR durchgeführt. Die Sensitivitätsgrenze des Antigentestes liegt bei ca. 10^4 viralen Partikeln pro ml Serum, die Sensitivität der PCR bei 10-100 RNA-Kopien pro ml. Lassa-Antikörper werden entweder mittels ELISA unter Verwendung von inaktiviertem, Lassavirus-haltigem Zellkultur-Überstand detektiert oder mittels indirekter Immunfluoreszenz unter Verwendung von Lassavirus-infizierten Zellen (Bausch et al., 2000; Drosten et al., 2003; Gunther und Lenz, 2004; Johnson et al., 1981, ter Meulen et al., 1998; u.a.). Da die in den genannten Tests verwendeten Antigene und Reagenzien nur in Hochsicherheitslaboren hergestellt werden können und für die Verschickung inaktiviert werden müssen, werden sie selten in die Lassa-endemischen Gebiete versandt. Deshalb wurden Antikörper-Detektionsteste unter Verwendung rekombinanter, nicht-infektiöser Lassaproteine entwickelt (Barber et al., 1990; ter Meulen et al., 1998). Aufgrund von Sensitivitäts- und Spezifitätsproblemen, ungenügender klinischer Evaluierung sowie beschränkter Verfügbarkeit sind diese jedoch normalerweise ebenfalls in den endemischen Gebieten nicht vorhanden. Deshalb werden akute Lassafälle in Westafrika z.Zt. in der Regel nur klinisch diagnostiziert. Eine Laborbestätigung erfolgt nur unter besonderen Umständen, z.B. im Fall einer vermuteten Epidemie und erfordert

die Verschickung von Patientenmaterial in ein Referenzlabor. Der Transport von Probenmaterial von vermuteten Lassafieber-Patienten kann nur unter hohen Sicherheitsauflagen erfolgen und wird von vielen Kurierdiensten abgelehnt. Den Gesundheitsbehörden der betroffenen Länder Westafrikas liegen deshalb nur sehr unzureichende Informationen über die tatsächliche Inzidenz, Prävalenz und das lokal stark variierende Vorkommen von Lassafieber vor.

2.6 Prävention

Eine ideale Präventionsmaßnahme, die Unterbrechung des Kontaktes zwischen Ratten und Menschen durch flächendeckende Rattenkontrollprogramme, wird von McCormick und Fisher-Hoch (2002) unter den gegenwärtigen sozialen Umständen als nicht umsetzbare Methode betrachtet. Zudem liegen in etlichen Regionen nur ungenügende seroepidemiologische Daten vor, die eine Fokussierung der Präventionsmaßnahmen erlauben würden. Fisher-Hoch et al. (2000) und Geisbert et al. (2005) zeigten tierexperimentell, dass eine Impfung auf der Basis replikationskompetenter viraler Vektoren (Vakziniavirus, vesikuläres Stomatitisvirus) welche Lassa-Strukturproteine exprimieren, einen 80-100%igen Schutz im Affen gegen eine ansonsten tödlich verlaufende Infektion bieten. Ein beim Menschen zugelassener Impfstoff existiert gegenwärtig noch nicht und wird wegen der fehlenden Investitionsbereitschaft der Industrie und des fehlenden Marktes auf absehbare Zeit auch nicht entwickelt werden.

2.7 Therapie

Eine stationäre Behandlung unter „barrier nursig“ verringert effektiv die Übertragung von Mensch zu Mensch (CDC, 2002; Fisher-Hoch et al., 1985). Die intravenöse Therapie mit dem Virustatikum Ribavirin wird bei Patienten mit Lassa-Fieber mit Erfolg eingesetzt, besonders wenn es in den ersten 6 Tagen nach Beginn der Erkrankung verabreicht wird (McCormick et al., 1986). Im Regelfall wird Ribavirin in den betroffenen Ländern aufgrund ökonomischer

Gesichtspunkte nicht verabreicht bzw. ist gar nicht vorhanden. Die weitere Therapie erfolgt symptomatisch durch Regulation des Flüssigkeits- und Elektrolythaushalts, des Blutdrucks, ausreichender Oxygenierung und der Behandlung anderer Infektionen.

Bei Patienten mit importierten Lassa-Infektionen (ter Meulen 2000) kann trotz optimaler Intensivbehandlung ein letaler Krankheitsausgang nicht immer verhindert werden (Fleischer et al., 2000; Schmitz et al., 2000)

2.8 Fragestellung und methodischer Ansatz

Hypothese der Doktorarbeit:

Wegen der hohen Inzidenz von Lassa-bedingter Taubheit und der Irreversibilität dieses Symptoms in 60% der Fälle ist in Lassa-endemischen Gebieten eine audiometrische Untersuchung zur einfachen und schnellen Identifizierung von Patienten mit immunologischen Labormarkern einer durchgemachten Lassavirus-Infektion geeignet.

Die vorliegende Arbeit untersucht Schwerhörigkeit von Probanden in einem Lassa-Niedrigprävalenzgebiet Guineas und betrachtet diese im Zusammenhang mit immunologischen Markern einer durchgemachten Lassavirus-Infektion. Untersucht werden der positive und der negative Vorhersagewert eines pathologischen Hörtests (Schallempfindungsschwerhörigkeit mit einer Hörschwelleminderung von $\geq 41\text{dBHL}$ auf einem oder beiden Ohren) in Bezug auf Lassa-Antikörper und T-Zell-Antwort bei schwerhörigen Probanden.

In der vorliegenden Arbeit wurden deshalb in einem bekannten Niedrigprävalenzgebiet für Lassafieber (ca. 4% Seroprävalenz, Lukashevich 1992) folgende Fragestellungen untersucht:

- Wie groß ist die Prävalenz von immunologischen Lassa-Markern bei Personen mit Schallempfindungsschwerhörigkeit und gepaarten Kontrollen?

- Besteht eine quantitative Korrelation zwischen dem Schweregrad der Schallempfindungsschwerhörigkeit und immunologischen Lassa-Markern?
- Wie groß ist der positive Vorhersagewert eines pathologischen Hörtests zur Identifikation von Personen mit immunologischen Lassa-Markern ?

3 Patienten, Material und Methoden

3.1 Studiendesign

Als Studiendesign wurde eine Fall-Kontrollstudie gewählt, um die Häufigkeit von immunologischen Markern einer Lassavirus-Infektion in zwei Gruppen von Probanden zu vergleichen. Hierzu wurden 100 Personen mit anamnestisch erhobener Schwerhörigkeit aus 22 zufällig ausgewählten Dörfern einer Lassa-Niedrigprävalenzregion mit 100 alters- und geschlechtsgepaarten Kontrollen aus denselben Dörfern verglichen. Hierbei handelte es sich um Personen zwischen 6 – 80 Jahren, die seit mindestens 5 Jahren in dem jeweiligen Dorf wohnten und für die Dauer der Studie ansässig blieben. Es wurde nach Schwerhörigen gesucht, bei denen eine Hörminderung erstmals während oder nach einer fieberhaften Erkrankung auftrat. Die Probanden wurden mittels einfacher Hörschwellenmessung und Rinne-Test einer von drei Gruppen zugeteilt:

1. Normale Hörschwelle (= Kontrollgruppe)
2. Schalleitungsschwerhörigkeit
3. Schallempfindungsschwerhörigkeit (Definition siehe unter Abschnitt 3.5.3)

Bei allen Personen wurden Lassa-Antikörper mittels indirekter Immunfluoreszenz sowie die Lassa-spezifische T-Zell-Antwort mittels Lymphozytenproliferation gemessen.

Für die Stichprobenberechnung mussten Annahmen zu den erwarteten Häufigkeiten der Merkmale „Lassa-Marker positiv“ und „Lassa-Marker negativ“ in der Gruppe der Probanden mit Schallempfindungsschwerhörigkeit und der Kontrollgruppe gemacht werden. Hierzu wurde die Hälfte der aus der Literatur bekannten Lassa-Seroprävalenz von 4% im Studiengebiet als Seroprävalenz für die Kontrollgruppe angenommen, d.h. 2%. Bislang wurde nur eine Prävalenzstudie zur Häufigkeit von Lassa-Markern in einem Lassa-Hochprävalenzgebiet bei Personen mit Schwerhörigkeit publiziert (Cummins et al., 1990). Basierend auf der großen Häufigkeit von Taubheit nach Lassafieber in der Literatur wurde die Hypothese geäußert, dass Lassafieber den häufigsten Grund für erworbene Taubheit in Westafrika darstellen könnte (Cummins et al.,

1990; Rybak, 1990). Deshalb wurde eine Häufigkeit von 20% für Lassamarker bei Probanden mit nachgewiesener Schallempfindungsstörung zugrunde gelegt. Ferner musste eine Annahme über den Anteil von sensorineuraler Schwerhörigkeit an der Gesamtschwerhörigkeit gemacht werden, da hierzu ebenfalls wenige Daten aus Westafrika vorliegen. Es wurde daher davon ausgegangen, dass bei 40-50% der anamnestisch erhobenen Personen mit einer Schwerhörigkeit eine sensorineurale Störung zugrunde liegt (Westerberg et al., 2005).

Bei einer gewünschten „Test-Power“ von 80% und einem Signifikanzniveau von 5% ergab die Berechnung der Stichprobengröße $n=46$ Personen je Gruppe, d.h. ca. 100 Personen mit anamnestisch erhobener Taubheit und 100 Kontrollpersonen mit anamnestisch normalem Gehör mussten in die Studie aufgenommen werden.

Da die avisierten Gruppengrößen letztlich nicht realisiert werden konnten, erfolgte die Analyse einer Korrelation der immunologischen Lassa-Marker mit unterschiedlich ausgeprägter sensorineuraler Schwerhörigkeit durch den Mantel-Haenszel Test für Trend, um zu statistisch signifikanten Ergebnissen gelangen zu können.

Die Studie wurde im Rahmen langjähriger Untersuchungen des Bernhard-Nocht-Institutes und des Institutes für Virologie der Philipps-Universität Marburg zur humanen Immunantwort gegen Lassa-Fieber durchgeführt, für die eine Genehmigung der Ethikkommission des Gesundheitsministeriums Guineas vorliegt.

3.2 Untersuchungsgebiet und Bevölkerung

Das Untersuchungsgebiet, die Region Bouramaya, liegt in der westafrikanischen Republik Guinea (siehe Anhang, Abb. 1a/b). Dieses für Lassa-Fieber endemische Gebiet befindet sich nördlich der Hauptstadt Conakry im Verwaltungsbezirk Dubréka und setzt sich aus den Unterbezirken Wassou und Tanéné zusammen. Diese werden durch den Fluss Konkouré unterteilt. Auf

einer Fläche von $3840,4\text{km}^2$ leben 57.606 Einwohner, dies entspricht einer Bevölkerungsdichte von 15 Personen/ km^2 .

Die Bevölkerung gehört hauptsächlich zur Ethnie der Susu, vorherrschende Religion ist der Islam. Das Leben in den Dörfern geschieht unter sehr einfachen Bedingungen, ohne Strom und fließend Wasser. Es gibt kaum Möglichkeiten Bargeld zu verdienen und Nahrungsmittel des täglichen Bedarfs werden überwiegend selbst angebaut. Der nicht alphabetisierte Bevölkerungsanteil beträgt etwa 60%.

3.3 Patientenauswahl

In den Monaten März und April 2002 machten Mitarbeiter des „Projet de Recherche sur les Fièvres Hémorragiques en Guinée“ insgesamt 200 Probanden in dem oben genannten Untersuchungsgebiet ausfindig. Die Verwaltungsämter der Unterbezirke Wassou und Tanéné stellten Listen mit allen Dörfern der Region zur Verfügung, hieraus wurden 22 Dörfer zufällig ausgelost. In jedem Dorf wurde zunächst mit den Dorfältesten über die geplante Studie gesprochen, mit deren Erlaubnis und Unterstützung dann Probanden gesucht wurden. Dabei wurde nach Personen gesucht, die eine Minderung des Hörvermögens während oder nach einer fieberhaften Erkrankung erlitten hatten. Auch diese wurden über Inhalte und Ziele der Studie in der dortigen Regionalsprache Susu aufgeklärt. Es wurden 100 schwerhörige Probanden gefunden, zu denen passend nach Alter und Geschlecht im selben Dorf Kontroll-Personen ausfindig gemacht wurden, die kein Hördefizit angaben. Mit den Probanden wurden Termine zur Durchführung einer Untersuchung vereinbart. Diese beinhaltete neben einer allgemeinen klinischen Untersuchung, einer Ohrenuntersuchung und einem Hörschwellentest auch eine Blutabnahme zur Gewinnung von Serum. Die Mitwirkung an den Untersuchungen und den Blutspenden fand auf freiwilliger Basis statt.

Zur Gewinnung von Lymphozyten im Labor des PFHG wurde mit den Probanden ein weiterer Termin in den Monaten Mai bzw. Juni 2002 vereinbart. Über einen Zeitraum von fünf Wochen wurden täglich 5-10 Probanden von

einem Arzt und einem Fahrer aus ihren Dörfern in die Hauptstadt Conakry geholt (siehe Anhang Abb. 2a/b/c). Als Aufwandsentschädigung erhielten die Probanden umgerechnet etwa 5 Euro, außerdem wurde Verpflegung bereitgestellt sowie Vitaminpräparate und Paracetamol verteilt. Einige Dorfbewohner mit akuten Erkrankungen wurden an der Universitätsklinik Donka in Conakry auf Kosten des Projektes behandelt.

Als Einschlusskriterien galten eine vorhandene Hörschwellenprüfung, Serumspenden, sowie Vollblutspenden mit Gewinnung von ausreichend (mindestens 5×10^6) Lymphozyten. Aufgrund von logistischen Schwierigkeiten wurden die Einschlusskriterien nicht von allen Probanden erfüllt.

3.4 Befragung der Probanden

Durch Befragungen der Probanden bzw. deren Angehöriger mittels eines standardisierten Fragebogens (siehe Anhang) wurden Informationen über Taubheit, fieberhafte Erkrankungen, Einnahme von Arzneimitteln und den Kontakt zu Ratten ermittelt. Bei Bedarf wurden die Fragen in der Regionalsprache Susu geklärt.

Es wurden der Zeitpunkt und die Dauer der fieberhaften Erkrankung ermittelt, die mit einer Beeinträchtigung des Hörvermögens einherging. Es wurde gefragt, ob die Hörbeeinträchtigung während oder nach der Erkrankung eintrat, das Eintreten plötzlich oder schleichend war und ob die Beeinträchtigung dauerhaft oder temporär und total oder partiell war.

Die Probanden sollten angeben, ob sie zum Zeitpunkt der Erkrankung, die zur Taubheit führte, unter folgenden Symptomen bzw. Krankheiten litten: starkes Fieber, Kopfschmerz, Myalgie, Dysphagie, Husten, Konjunktivitis, retrosternale Schmerzen, Gesichtssödem und Hämorrhagien.

Es wurde gefragt, ob vor dem Auftreten der Erkrankung Kontakt zu Ratten bzw. deren Exkrementen vorhanden war und ob Ratten als Nahrungsquelle dienten.

Weiterhin wurde erfragt, ob und welche medikamentöse Therapie bei der Behandlung der zur Taubheit führenden Erkrankung durchgeführt wurde bzw. ob traditionelle Behandlungsmethoden gewählt wurden.

3.5 Klinische Untersuchungen

Alle Probanden wurden in den Dörfern durch einen Arzt des PFHG orientierend klinisch untersucht.

3.5.1 Allgemeine klinische Untersuchung

Neben der Ermittlung von Vitalparametern und Körpertemperatur wurden Haut, Schleimhäute und Lymphknoten untersucht. Außerdem wurden Herz, Lunge und Abdomen klinisch untersucht. Es sollte ausgeschlossen werden, dass akut kranke Personen an der Studie teilnehmen.

3.5.2 Otoskopie

Bei allen Probanden wurde eine Untersuchung der Ohren durchgeführt. Neben der Beurteilung des äußeren Ohres wurde mittels Otoskopie der äußere Gehörgang untersucht. Es wurde das Vorhandensein von Zerumen und Eiter sowie der Zustand des Trommelfells dokumentiert.

Bei 10 Probanden habe ich die Untersuchung der Ohren in Conakry wiederholt. Außerdem bestätigte der Chef der Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde (Dr. Baba Oumar Bah, médecin chef adjoint en ORL) an der Universitätsklinik Donka in Conakry die Untersuchungsergebnisse von 10 Probanden.

3.5.3 Audiometrie

Die Hörprüfungen wurden in ruhiger Atmosphäre, meist abseits der Dörfer im Geländewagen des PFHG durchgeführt (siehe Anhang, Abb. 3). Durch Stimmgabelprüfungen wurde primär zwischen Schalleitungs- und Schallempfindungsschwerhörigkeit differenziert. Der Rinne-Versuch diente zum monauralen Vergleich von Luft- und Knochenleitung, der Weber-Versuch zur binauralen Prüfung der Knochenleitung.

Zur Messung der Luftleitung wurden mit einem tragbaren Audiometer (Maico MA 25) die Hörschwellen folgender Frequenzen in dBHL ermittelt: 500Hz, 750Hz, 1000Hz, 1500Hz, 2000Hz, 3000Hz, 4000Hz, 6000Hz, 8000Hz. Getestet wurde für jede Frequenz von 0dBHL bis maximal 85dBHL. Wenn aufgrund einer schweren Hörstörung eine Antwort vom Patienten ausblieb, wurde ein Wert von 110dBHL gegeben. Roeser (2000) beschreibt den korrekten Ablauf der Hörschwellenaudiometrie, nach dessen Kriterien verfahren wurde. Das bessere Ohr wurde generell zuerst untersucht, beginnend mit der Frequenz von 1000Hz bei Steigerung der Lautstärke in 5dBHL-Schritten. Danach wurden die Hörschwellen der höheren Frequenzen bis 8000Hz und anschließend der tieferen Frequenzen von 250-750Hz gemessen. Bei 10 Probanden habe ich die Hörschwellenprüfung (nach Roeser, 2000) in Conakry wiederholt. Außerdem wurden die Ergebnisse der Hörschwellenprüfung bei 10 Probanden in der Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde an der Universitätsklinik Donka in Conakry wiederholt und bestätigt. Zusätzlich wurde bei diesen Probanden die Hörschwelle der Knochenleitung gemessen.

Zur Einteilung der Probanden in eine Gruppe mit Hörminderung und eine Kontrollgruppe mit normalem Gehör wurden mittlere Hörschwellen (PTA=Pure Tone Average) im Frequenzbereich des Sprachverstehens gebildet. Gemäß Richtlinien der „American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery“ wurde hierzu die Summe der Hörschwellen der Frequenzen 500Hz, 1000Hz, 2000Hz und 3000Hz durch vier dividiert, wodurch sich eine mittlere Hörschwelle in dBHL für das jeweilige Ohr ergab (Hall, 2001). Probanden mit mittleren Hörschwellen im klinisch normalen Bereich zwischen 0-20dBHL wurden der Kontrollgruppe zugeordnet. Hörschwellen über 20dBHL wurden der Gruppe mit Hörminderung zugeordnet und nochmals nach Schweregraden unterteilt:

(1) mild hearing loss: 21-40dBHL, (2) moderate hearing loss: 41-60dBHL, (3) severe hearing loss: ≥ 61 dBHL.

Nach otoskopischer Untersuchung sowie mittels Stimmgabeltests nach Weber und Rinne wurde die Störung zusätzlich nach Lokalisation unterteilt. Die Zuteilung zur Gruppe der Schallempfindungsstörung setzte einen positiven Rinne-Test sowie ein intaktes Trommelfell voraus. Bei 31 Probanden wurde

zusätzlich mit einem Audiometer (Selector SH 02) die Hörschwelle der Knochenleitung für Frequenzen von 500-3000Hz gemessen, um die Qualität der orientierenden Einteilung in Schallempfindungs- und Schalleitungsstörung anhand der Stimmgabeltests zu überprüfen.

3.6 Serologie

Zum Nachweis von Lassavirus-spezifischen Antikörpern wurde eine indirekte Immunfluoreszenz durchgeführt. Bei dieser Methode werden Objektträger, auf die Lassavirus-infizierte Zellen aufgebracht wurden, mit Serum (Probandenserum) überschichtet und inkubiert. Nach anschließendem Waschen des Präparates wird ein fluoreszierendes (FITC gekoppeltes) Antigammaglobulin aufgebracht. Dieses reagiert mit spezifischen Antikörpern des Probandenserums, soweit diese an Lassa-Antigen tragenden Zellen gebunden sind und somit nicht beim vorherigen Waschen beseitigt wurden. Aufleuchten des erwarteten Antigenmusters unter dem Fluoreszenzmikroskop bedeutet, dass das Probandenserum den spezifischen Lassa-Antikörper enthält. Durch Zugabe eines Lassavirus-spezifischen monoklonalen Mausantikörpers zu dem Probandenserum und zusätzlicher Verwendung eines fluoreszierenden (Rhodamin gekoppelten) Anti-Maus-Immunglobulins kann eine Gegenfärbung erzielt werden. Durch Betrachtung des Präparates bei verschiedenen Wellenlängen (419nm [blau]: FITC leuchtet grün; 531nm [grün]: Rhodamin leuchtet rot) kann so ein Vergleich zwischen fluoreszierenden Arealen gemacht werden, die aufgrund von unspezifisch oder aufgrund von spezifisch gebundenen Antikörpern leuchten.

Die serologische Diagnostik wurde in Zusammenarbeit mit Herrn PD Dr. Jan ter Meulen am Institut für Virologie der Philipps-Universität Marburg durchgeführt.

Für die Laborarbeiten in Marburg wurden folgende Materialien verwendet:

Medium:

- PBS^{def}: 1000ml dH₂O + 8,0g NaCl + 0,2g KCl + 1,15g Na₂HPO₄
+ 0,2g KH₂PO₄

Die Chemikalien wurden von Merck, Darmstadt bezogen.

Antikörper:

- Anti-Maus-Immunglobuline von der Ziege, DAKO, Dänemark
Rhodamin gekoppelt
- Anti-Human-Immunglobuline vom Kaninchen, DAKO, Dänemark
FITC-gekoppelt
- Monoklonaler Mausantikörper spezifisch gegen Lassa NP
(von PD Dr. Jan ter Meulen, Virologisches Institut Marburg, nach Hufert et al., 1989)

Es wurden Objektträger benutzt, die von Herrn PD Dr. Jan ter Meulen mit Lassa-Virus infizierten Zellen (Vero-Zellen 76, Lassavirus-Stamm Josiah) beschichtet und inaktiviert wurden. Pro Feld wurde 20µl Patientenserum (1:20 in PBS^{def}) und zugefügten monoklonalen Maus-AK (Verdünnung 1:50) aufgetragen. Als Kontrolle diente ein humanes Serum mit Anti-Lassa spezifischen Antikörpern und ein humanes Serum, welches keine Anti-Lassa Antikörper aufweist. In einer feuchten Kammer wurden die Objektträger bei 37° Celsius für eine Stunde inkubiert. Danach wurden diese mit PBS^{def} abgespült und mittels einer Küvette für 3 x 15min auf einem Schüttler bei Raumtemperatur gewaschen. Nun wurde der Bereich um die Felder mit einem Papiertuch getrocknet und pro Feld 20µl von FITC-gekoppelten Anti-Human-Immunglobulinen vom Kaninchen (1:70 in PBS^{def}) und Rhodamin-gekoppelten Anti-Maus-Immunglobulinen von der Ziege (1:100 in PBS^{def}) aufgetragen. Die Objektträger wurden erneut für 30min in einer feuchten Kammer bei 37° Celsius inkubiert und nach Abspülen mit PBS^{def} für 2 x 15min gewaschen. Auf die Objektträger wurden blasenfrei Deckgläser aufgebracht und diese dann unter

dem Fluoreszenzmikroskop (Axiophot, Zeiss, Weimar) bei 40facher Vergrößerung beurteilt. Mit einer Digitalkamera wurden Fotos von einem positiven und einem negativen Probanden-Serum gemacht (S.37, Abb. 5).

3.7 T-Zell-Proliferation

Binden in vivo MHC-Antigen-Komplexe auf der Oberfläche von Antigen-präsentierenden Zellen an den T-Zell-Rezeptor, kommt es zur Aktivierung und Proliferation der T-Zelle. Diesem Ansatz folgend werden beim T-Zell-Proliferationsassay periphere mononukleäre Zellen in vitro mit verschiedenen Proteinen und Peptiden inkubiert. Die in der Präparation enthaltenen Makrophagen nehmen das Protein-Antigen auf, prozessieren es und präsentieren es über MHC-II. Die zugegebenen Peptide binden aufgrund ihrer kurzen Länge direkt an das MHC-II Molekül. Die Quantifizierung der CD4 T-Zell-Proliferation erfolgt über den Einbau von ³H-Thymidin in die zelluläre DNA als Maß für das Zellwachstum.

Zur Messung der T-Zell-Proliferation wurden mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC) aus heparinisierten Vollblutproben der Probanden gewonnen. Zur Durchführung der Blutentnahmen holten ein Arzt und ein Fahrer des PFHG über einen Zeitraum von fünf Wochen täglich 5-10 Probanden aus ihren Dörfern nach Conakry. Die aus dem Vollblut isolierten PBMC wurden eingefroren und konserviert in einem Stickstoff-Tank an das Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin in Hamburg geschickt. Hier fanden die Stimulation der PBMC sowie die Messung der T-Zell-Proliferation statt.

Für die Laborarbeiten in Guinea wurden folgende Reagenzien und Verbrauchsmaterialien verwendet:

- | | |
|--|-----------------------------|
| - Salzsäure (HCL) | Sigma, Taufkirchen |
| - Trypanblau 0,5 % | Serva, Heidelberg |
| - Ficoll-Seperationsmedium, Dichte 1.077 | Seromed Biochrom KG, Berlin |
| - Gentamycin 50mg/ml | Whittaker, Maryland |

- | | |
|---------------------------------------|------------------------------|
| - Harnstoff | Biomol, Hamburg |
| - DMSO (Dimethylsulfoxid) | Sigma, Taufkirchen |
| - FCS (Fetal bovine serum) | Sigma, Taufkirchen |
| - Falcon Röhrchen 50 ml konisch | Becton Dickinson, Heidelberg |
| - Gewebekulturplatten 96 well, u-Form | Greiner, Frickenhausen |
| - Cryo-Tubes 1,8 ml | Nalge Nunc, Wiesbaden |

Es wurden folgende Puffer und Medien eingesetzt:

- | | | |
|------------------------------------|--|-------------------------|
| - PBS (Phosphate buffered saline): | NaCl | 8,0g |
| | KCl | 0,2g |
| | Na ₂ HPO ₄ | 1,15g |
| | MgCl ₂ | 0,1g |
| | KH ₂ PO ₄ | 0,2g |
| | CaCl ₂ | 0,13g |
| | | ad 1l dH ₂ O |
| - Kulturmedium: | 500ml PBS + 0,5ml Gentamycin (50mg/ml) | |
| - Gefriermedium: | 80% FCS inaktiviert (1/2 h bei 50° Celsius) + 20% DMSO | |

Für die Laborarbeiten in Hamburg wurden folgende Reagenzien und Verbrauchsmaterialien verwendet:

- | | |
|--------------------------------------|------------------------------|
| - RPMI 1640 | PAA Laboratories, Linz |
| - L-Glutamine 29,3 mg/ml, 200mM | PAA Laboratories, Linz |
| - Salzsäure (HCL) | Sigma, Taufkirchen |
| - Trypanblau 0,5 % | Serva, Heidelberg |
| - Gentamycin 50mg/ml | Bio Whittaker, Maryland |
| - FCS (Fetal bovine serum) | Sigma, Taufkirchen |
| - HUS (Humanserum der Blutgruppe AB) | Blutbank UKE, Hamburg |
| - PHA (1µg/ml) | Murex Biotech, UK |
| - Falcon Röhrchen 15 ml konisch | Becton Dickinson, Heidelberg |
| - Falcon Röhrchen 50 ml konisch | Becton Dickinson, Heidelberg |

- Gewebekulturplatten 96 well, u-Form Greiner, Frickenhausen
- Gewebekulturplatten 96 well, flat bottom Greiner, Frickenhausen

Es wurde folgendes Medium angesetzt:

- RPMI⁺⁺: 500ml RPMI 1640 + 5ml L-Glutamine + 0,5ml Gentamycin

3.7.1 Lymphozytenisolation

Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC) wurden aus heparinisierten Vollblutproben (45ml/Pat) mittels eines Dichtegradienten abgetrennt. Alle Arbeitsschritte wurden unter einer sterilen Arbeitsbank (Nuaire Labgard class II Laminar flow, NU 440-400 E) auf Eis durchgeführt. Jeweils 1ml des Vollblutes wurde in ein Cryotube überführt und dort mit 1ml bereits vorgelegtem 8M Harnstoff gemischt und bei 4° Celsius gelagert, um später bei Bedarf genetische Untersuchungen (MHC-Typisierung) durchführen zu können. Das heparinisierte Blut wurde direkt nach der Blutentnahme auf das Separationsmedium aufgetragen, aufgeteilt auf zwei 50ml Falcon Röhrchen mit je 12ml Ficoll. Der Gradient wurde 20min bei 2000U/min unter Kühlung und ohne Bremse zentrifugiert (Minifuge, Heraeus Christ). Die weiße Schicht aus Leukozyten wurde vorsichtig mit einer 5ml Pipette abgesaugt und zweimal mit Kulturmedium gewaschen, um das verbleibende Separationsmedium zu entfernen. Beim ersten Waschgang wurde die doppelte Menge Kulturmedium hinzugefügt, beim zweiten Waschgang wurden die Zellen eines Probanden in einem 50ml Falcon Röhrchen zusammengefasst und auf 12ml mit Kulturmedium aufgefüllt. Es wurde jeweils für 8min bei 1300U/min mit aktivierter Bremse zentrifugiert (Universal 16A, Hettich) und der Überstand mit einer Pasteurpipette abgesaugt. Das Sediment aus PBMC wurde dann mit Kulturmedium auf 1ml aufgefüllt und gemischt. Die Anzahl der lebenden Zellen wurde mit einer Neubauer-Zellzählkammer (Hecht-Assistent, Sondheim, Deutschland) ermittelt. Hierzu wurden 10µl der Zellsuspension mit 40µl Trypanblau in einer u-förmigen 96well Gewebekulturplatte gemischt und hiervon 10µl in die Zählkammer aufgetragen. Mit dem Mikroskop (Leitz Bio Med) wurde

unter 10-facher Vergrößerung die Anzahl der Zellen/ml ermittelt. Je nach Zellmenge wurde entschieden, ob das Volumen der Zellsuspension durch Zugabe von Kulturmedium erhöht werden musste. Hierbei wurde darauf geachtet, dass die Konzentration mindestens 5×10^6 Zellen/ml betrug.

3.7.2 Einfrieren der PBMC

Zum Einfrieren der PBMC wurde tropfenweise unter Schütteln Gefriermedium in einer Verdünnung 1:2 zugegeben und dann je nach Volumen in 2ml Portionen auf 1-4 Cryotubes verteilt. Diese wurden umgehend in einer Gefriertruhe bei minus 80° Celsius gelagert. Nach 12–24 Stunden wurden die Cryotubes in einen Stickstofftank mit einer Temperatur von -180° Celsius überführt. Die eingefrorenen PBMC wurden schließlich in dem Stickstofftank an das Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin geschickt.

3.7.3 Auftauen der PBMC

Am Hamburger Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin wurden die Cryotubes mit den PBMC dem flüssigen Stickstoff entnommen und aufgetaut. Die Flüssigkeit wurde in ein 15ml Falcon Röhrchen pipettiert. Unter Schütteln wurde tropfenweise RPMI⁺⁺-Medium bis zu einem Volumen von 12ml hinzugefügt und gemischt. Die Zellen wurden nun zweimal gewaschen. Hierfür wurde jeweils für 8min bei 1300U/min, 4° Celsius, mit Bremse, zentrifugiert (Minifuge T, Heraeus Sepatech) und der Überstand mit einer Pasteurpipette abgesaugt. Das Sediment aus PBMC wurde dann mit RPMI⁺⁺-Medium auf 1ml aufgefüllt und gemischt. Die Anzahl der lebenden Zellen wurde mittels einer Neubauer-Zählkammer (siehe 2.6.1) bestimmt.

3.7.4 PBMC-Stimulation durch Antigene und Peptide

Zur Stimulation der PBMC wurden die, von Herrn PD Dr. Jan ter Meulen bereitgestellten, rekombinanten Lassavirus-Proteine GP-2 und NP (ter Meulen 2000) sowie ein „Pool“ aus drei hochkonservierten Peptiden (Pep.2, 3, 4, Referenz: ter Meulen 2004) des ungespaltenen Vorläuferproteins GP-C eingesetzt. Außerdem wurde ein von Herrn Prof. Dr. Achim Hörauf

bereitgestelltes Gelbfieberimpfvirus eingesetzt. Als Positivkontrolle dienten Phythämagglutinine (PHA) und Tuberkuline (PPD), als Negativkontrolle wurde nur RPMI⁺⁺-Medium eingesetzt.

Die PBMC-Stimulationen wurden in u-förmigen 96well Gewebekulturplatten mit einem Endvolumen von 200µl durchgeführt. Die aufgetauten PBMC wurden auf eine Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml Kulturmedium zuzüglich 10% Humanserum eingestellt. Es wurden 1×10^5 Zellen/well mit einem Volumen von 100µl vorgelegt. Hinzugefügt wurden die rekombinanten Proteine (13µg/ml Endkonzentration) und Peptide (1µg/ml Endkonzentration) in jeweils 50µl/well. Die wells wurden mit 50µl RPMI⁺⁺, im Falle der Negativkontrolle mit 100µl RPMI⁺⁺, auf ein Endvolumen von 200µl aufgefüllt. Alle Tests, mit Ausnahme von sieben PBMC-Stimulationen, wurden als 3-fach-Werte bzw. im Falle der Stimulation mit dem Peptid-Pool als 6-fach-Werte durchgeführt. Bei den sieben Ausnahmen wurden aufgrund von geringem Zellvolumen nur Doppelt-Werte bzw. bei der Stimulation mit Peptid-Pool Vierfach-Werte ermittelt. Die Proben wurden in einem Brutschrank bei 37° Celsius für 72 Stunden gelagert.

Ein Überstand von 100µl/well wurde für spätere Zytokinmessungen in flache 96well Gewebekulturplatten pipettiert und bei -20° Celsius gelagert. Es wurde 25µl/well 0,2µCi ³H-Thymidin zu allen wells hinzugefügt und weitere 18 Stunden im Brutschrank inkubiert. Zum Messen der T-Zell-Proliferation wurden die wells mit einem Cell-Harvester (Inotech, Schweiz) auf einen Filter (Meltilex A, Wallac, Finnland) aspiriert, in einer Mikrowelle getrocknet und zusammen mit einer Szintillationsflüssigkeit (Beta Plate Scint, Wallac, Finnland) in Plastikfolie eingeschweißt. Mittels des Micro-Beta Counters 1450 (Wallac, Finnland) wurde die Proliferation in „counts per minute, (cpm)“ gemessen. Zur Auswertung wurden Mittelwerte der Proliferationsergebnisse ermittelt. Als Kriterien für positive T-Zell-Proliferation galten ein Wert größer als der Leerwert + 3 x die Standardabweichung oder ein Proliferationsindex (PI= Mittelwert Antigenstimulation/Mittelwert Leerwert) größer 2.

3.8 Zytokinmessung (IFN-gamma)

Beim Elispot-Test werden T-Zell-Populationen mit ausgesuchten Antigenen stimuliert und dann in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte gegeben, wo sich die Zellen absetzen. Die Vertiefungen sind mit monoklonalen Antikörpern gegen das Zytokin beschichtet, das untersucht werden soll. Wenn eine aktivierte T-Zelle dieses Zytokin freisetzt, wird das Molekül auf der Kunststoffoberfläche von dem Antikörper festgehalten. Nach einer bestimmten Zeit entfernt man die T-Zellen und weist das gebundene Zytokin durch einen zweiten zytokinspezifischen Antikörper nach, der an ein Enzym gebunden ist. Nach der Bindung dieses Antikörpers entsteht ein farbiges Reaktionsprodukt. Aufgrund der Zahl der entstandenen Flecken und der bekannten Anzahl der T-Zellen, die vorher in die Vertiefung gegeben wurden, lässt sich die Häufigkeit von T-Zellen berechnen, die ein bestimmtes Zytokin freisetzen. Depletion von CD4- bzw. CD8-Zellen macht eine getrennte Erfassung dieser Zellen möglich, mittels Testung verschiedener Zytokine kann die Th1- von der Th2-Antwort unterschieden werden. In diesem Assay werden im Prinzip CD4- und CD8-Zellen erfasst, jedoch ist die CD4-Stimulation aufgrund der gewählten Peptidlänge wahrscheinlicher.

Zur Bestimmung der IFN-gamma Produktion wurden PBMC von 52 Probanden mittels Elispot-Verfahren am Hamburger Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin untersucht. Hierzu wurden folgende Reagenzien und Verbrauchsmaterialien verwendet:

- sterile 96er Multiscreen-HA Platten (MAHAS4510) Millipore, USA
- DAB (Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid) Sigma, Taufkirchen
- MAB 1-D1K Mabtech, Schweden
(Coating AK gegen humanes IFN-gamma)
- MAB 7-B6-1-Biotin Mabtech, Schweden
(Biotinylierter monoklonaler AK)
- Streptavidin (Avidin HRP) Pharmingen, Canada

- | | |
|-----------------------------------|--------------------|
| - BSA (bovines Serumalbumin) | Roth, Karlsruhe |
| - NiCl_2 (Nickelchlorid) | Sigma, Taufkirchen |
| - Tris-Puffer 100mM | |
| - NaHCO_3 | |
| - H_2O_2 | |

Es wurden folgende Puffer und Medien eingesetzt:

- PBS (Phosphate buffered saline): siehe unter 3.7
- Coating Puffer:
0,1M NaHCO_3 + monoklonaler Antikörper (MAB) 1-D1K (1mg/ml auf 2 $\mu\text{g/ml}$)
pH 9, 2 – 9, 5
- BSA 0,1%: Verdünnung in PBS
- Substratlösung:
10ml 100mM Tris pH 7,5
200 μl Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB) stock (40mg/ml)
50 μl NiCl_2 stock (80mg/ml)
mischen und filtrieren durch 0,2 μm Filter + 5 μl 30% H_2O_2

Zunächst wurden die Multiscreen-HA Platten unter sterilen Bedingungen mit dem α -IFN-gamma monoklonalen Antikörper beschichtet. Hierzu wurde jede Platte mit 200 μl /well PBS gespült und dann mit 100 μl /well Coating-Puffer über Nacht bei 4°C inkubiert. Nun wurde zweimal mit PBS gewaschen und danach mit 200 μl /well 1% BSA blockiert. Nach einer Stunde bei 37°C wurde erneut zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend folgte unter sterilen Bedingungen die Zugabe der PBMC (2×10^5 Zellen/well) und deren Stimulation durch die Antigene GP-2, NP, Peptidpool und Gelbfieberimpfvirus wie in Abschnitt 3.7.4 beschrieben. Als Positivkontrolle diente PHA, als Negativkontrolle wurde nur PBS-Medium eingesetzt. Alle Tests wurden als Zweifach-Messungen durchgeführt. Für 24 Stunden wurden die Proben in einem Brutschrank bei 37°C, 5% CO_2 inkubiert. Danach wurden die Platten 3x mit PBS gewaschen und mit 100 μl /well des MAB 7-B6-1-Biotin (1mg/ml auf 1 $\mu\text{g/ml}$) in 0,1% BSA (in

PBS) für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde erneut 3x mit PBS gewaschen und dann mit 100µl/well Streptavidin (Avidin-HRP 1:200) für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Danach erfolgte nochmals dreimaliges Waschen mit PBS. Abschließend wurde 100µl/well Substratlösung zugegeben, die Platte nach 3-5min ausgeklopft und die Reaktion mit Aqua dest. gestoppt. Die Auswertung der getrockneten Platten wurde mittels eines Elispot Lesegerätes (Elispot Bioreader-2000) durchgeführt. Zur Auswertung wurden Mittelwerte der Ergebnisse ermittelt. Als Kriterien für positive IFN-gamma Produktion galten ein Wert größer als der Leerwert + 3 x die Standardabweichung oder ein Detektionsindex ($DI = \frac{\text{Mittelwert Antigenstimulation}}{\text{Mittelwert Leerwert}}$) größer 2.

3.9 Statistische Methoden

Die Datenauswertung erfolgte mit Hilfe des Statistikprogramms StatView sowie mit Excel. Angewendet wurde der Mantel Haenszel Chi-Square Test für Trend. Die statistische Beratung erfolgte durch Dr. G.-J. Weverling, Crucell Holland B.V. Leiden, Niederlande.

4 Ergebnisse

Die vorliegende Arbeit untersucht die Schwerhörigkeit von Probanden in einem Lassa-Niedrigprävalenzgebiet Guineas und betrachtet diese im Zusammenhang mit immunologischen Markern einer durchgemachten Lassavirus-Infektion. Einschlusskriterien für die Studie waren eine Hörschwellenprüfung mit otoskopischer Untersuchung sowie Vollblutspenden zur Gewinnung von Lymphozyten und Serum. Letztendlich konnten 136 Personen aus 19 Dörfern in die Studie eingeschlossen werden.

4.1 Schwerhörigkeit

Insgesamt fallen 87 (64%) der 136 Probanden in die Gruppe der Schwerhörigen und 49 (36%) in die Kontrollgruppe. Die Gruppe der Schwerhörigen wurde nochmals mittels otoskopischer Untersuchung und Stimmgabeltests nach Weber und Rinne in Schallempfindungs- und Schalleitungsschwerhörigkeit unterteilt. Eine Störung der Schallempfindung zeigten 65 (74,7%), eine Störung der Schalleitung 22 (25,3%) Schwerhörige.

Die zur Qualitätskontrolle durchgeführte Bestimmung der Hörschwelle für die Knochenleitung bei 31 Personen bestätigte weitgehend die orientierende Einteilung der Lokalisation mittels Stimmgabeltests. Von 25 Probanden mit primär diagnostizierter sensorineuraler Schwerhörigkeit zeigten 12 Personen eine reine Schallempfindungsschwerhörigkeit mit Unterschieden zwischen Luft- und Knochenleitung von $\leq 10\text{dBHL}$, während 13 Personen zusätzlich eine Schalleitungskomponente, also streng genommen eine kombinierte Schwerhörigkeit aufwiesen. Die primäre Einteilung wurde dennoch wie im Studiendesign vorgesehen belassen. Ebenfalls bestätigt wurden 6 Probanden mit primär diagnostizierter Schalleitungsschwerhörigkeit.

Die Ergebnisse der audiometrischen Untersuchungen werden nach Schweregraden (Hall, 2001) und Lokalisation der Hörstörung in den Tabellen 1a (alle Schwerhörigen) und 1b (Personen mit Schallempfindungsschwerhörigkeit) dargestellt.

Tab. 1a Anzahl aller schwerhörigen Probanden unterteilt nach Schweregrad und Lokalisation

Hearing impairment	Hörschwelle in dBHL	Anzahl Probanden (mittleres Alter in Jahren) mit Störung im	
		linken Ohr	rechten Ohr
Mild hearing loss	21-40	29 (37,4)	35 (36,9)
Moderate hearing loss	41-60	28 (45,2)	26 (47,5)
Severe hearing loss	61+	18 (42,6)	21 (41,8)
Moderate + Severe	41+	46 (44,2)	47 (45,0)
Total	21+	75	82

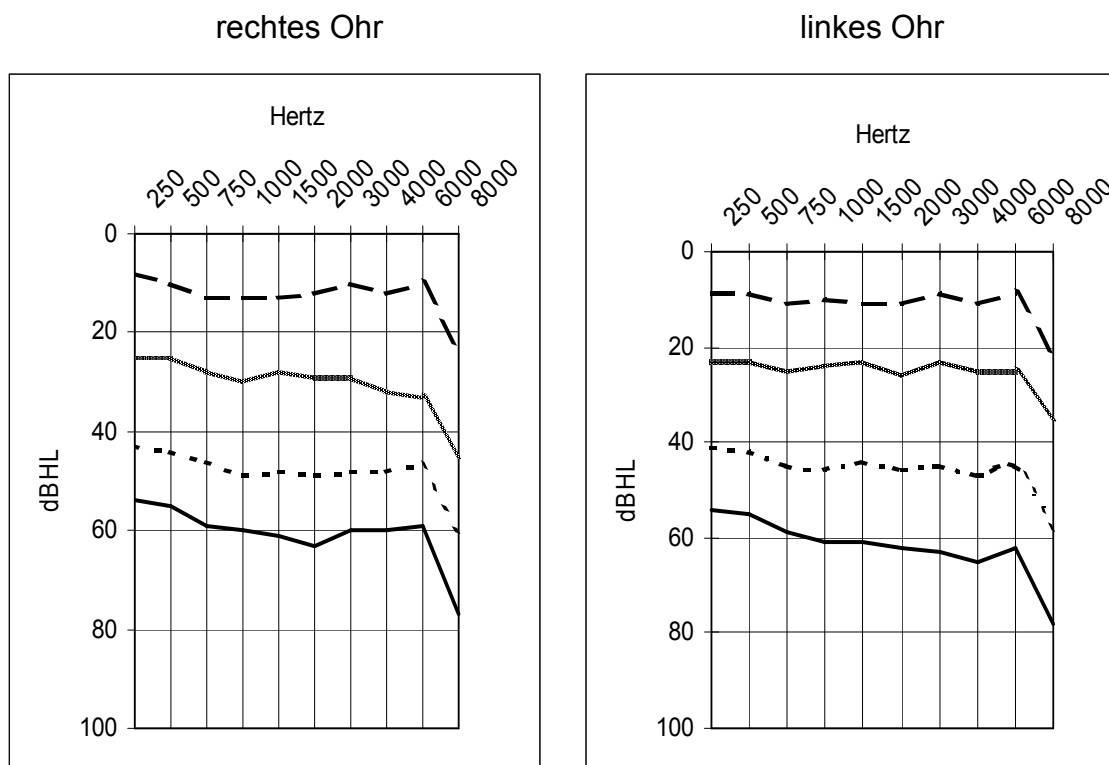
Tab. 1b Anzahl der Probanden mit Schallempfindungsschwerhörigkeit unterteilt nach Schweregrad und Lokalisation

Hearing impairment	Hörschwelle in dBHL	Anzahl Probanden mit Störung im	
		linken Ohr	rechten Ohr
Mild hearing loss	21-40	23	30
Moderate hearing loss	41-60	22	17
Severe hearing loss	61+	13	15
Moderate + Severe	41+	35	32
Total	21+	58	62

Von den 65 Probanden mit einer Schallempfindungsschwerhörigkeit hatten 38 (58,5%) Personen eine mittlere Hörschwelle von ≥ 41 dBHL (moderate + severe hearing impairment) in mindestens einem Ohr. Insgesamt zeigten 55 Schallempfindungsschwerhörige eine Störung beider Ohren, dies entspricht einem Anteil von 85%. Bei zehn Schallempfindungsschwerhörigen (15%) wurde eine monaurale Störung diagnostiziert. Totale bilaterale Schwerhörigkeit mit mittleren Hörschwellen von ≥ 90 dBHL auf beiden Ohren wurde bei vier Personen festgestellt. Totale monaurale Schwerhörigkeit zeigten zwei Personen auf dem rechten sowie eine Person auf dem linken Ohr.

Abbildung 4 stellt Audiogramme der mittleren Hörschwellen der Kontrollgruppe, der Schwerhörigen, sowie der Schallempfindungsschwerhörigen mit „mild hearing loss (21-40dBHL)“ und „moderate + severe hearing loss (≥ 41 dBHL)“ getrennt nach rechtem und linkem Ohr dar. Es fällt auf, dass in allen Gruppen die mittlere Hörschwelle bei 8000Hz einen Abfall hat.

Abb. 4: Audiogramme



Mittlere Hörschwelle normales Gehör (----), Schallempfindungsschwerhörigkeit 21-41dBHL (2. Linie von oben), Schwerhörigkeit gesamt (····), Schallempfindungsschwerhörigkeit ≥ 41 dBHL (—)

Schlussfolgerung:

Schwerhörigkeit in einem Lassa-Niedrigprävalenzgebiet Guineas, welche während oder nach einer fieberhaften Erkrankung aufgetreten ist, ist in etwa 3/4 der Fälle auf eine sensorineurale Störung zurückzuführen.

4.1.1 Patientenbefragung

Bei der Befragung mittels Fragebogen (siehe Anhang) gaben 85 Schwerhörige (97,8%), sowie alle Personen der Kontrollgruppe an, Kontakt zu Ratten gehabt zu haben. Mit Ausnahme von 27 Personen wurde das Fleisch der Ratten von den Probanden als Nahrungsmittel verwendet, wobei kein Unterschied in der Häufigkeit des Verzehrs zwischen der Kontrollgruppe und den Schwerhörigen bestand.

Die Schwerhörigen wurden über das Auftreten der Hörminderung in Bezug zur fieberhaften Erkrankung befragt. 48 Personen (55%) gaben an, dass die Schwerhörigkeit während der fieberhaften Erkrankung aufgetreten sei. Zehn Personen (11%) gaben an, dass die Schwerhörigkeit nach der Erkrankung aufgetreten sei. 29 Personen (33%) machten keine Angaben. Bezüglich der Manifestation der Schwerhörigkeit gaben 11 Personen (13%) einen plötzlichen und 50 Personen (57%) einen schleichenden Beginn der Hörminderung an. 26 Personen (30%) machten keine Angaben.

4.2 Immunologische Marker einer Lassavirus-Infektion

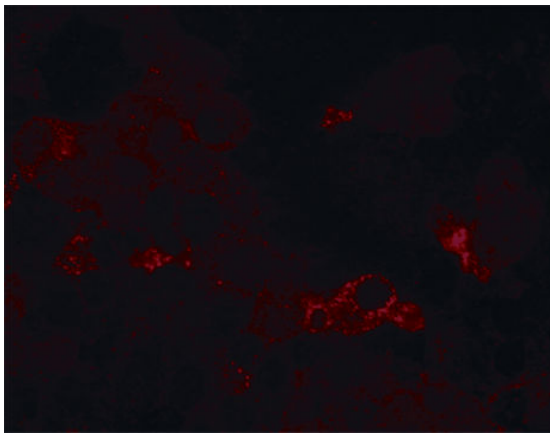
Als Marker einer durchgemachten Lassavirus-Infektion gelten virusspezifische Antikörper nachgewiesen durch serologische Tests, sowie die Messung der T-Zell-Proliferation nach Stimulation mit Lassavirus-Antigenen.

4.2.1 Serologie

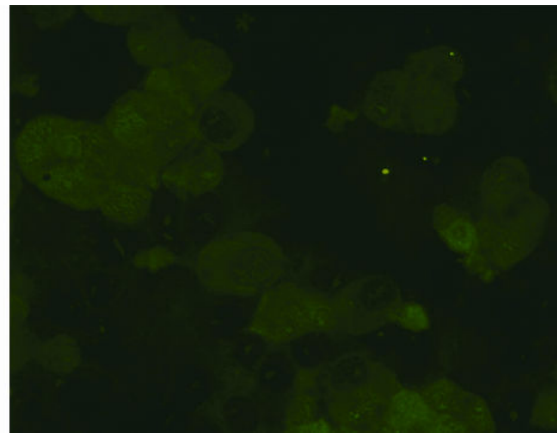
Zum Nachweis von virusspezifischen Antikörpern wurde Patientenserum mittels indirekter Immunfluoreszenz untersucht. Insgesamt zeigten 10 Probanden eine positive Reaktion.

Nachfolgend finden sich Abbildungen (Abb. 5a und 5b) der indirekten Immunfluoreszenz eines negativen und eines positiven Patientensersums.

Abb. 5a: Indirekte Immunfluoreszenz negativ

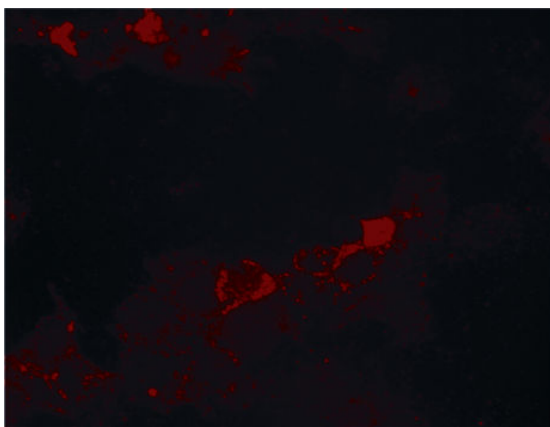


Positivkontrolle
(anti-Lassa Maus-mAb)

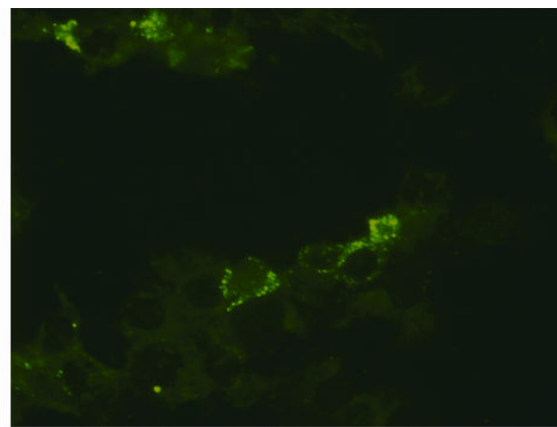


negatives Patientenserum

Abb. 5b: Indirekte Immunfluoreszenz positiv



Positivkontrolle
(anti-Lassa Maus-mAb)



positives Patientenserum

Eine Schallempfindungsschwerhörigkeit hatten acht der Antikörper-positiven Personen. Hiervon fallen sechs Probanden in die Gruppe „Moderate bzw. Severe Hearing loss“ (Hörschwelle 41+ dBHL). Demgegenüber reagierten nur ein Proband der Kontrollgruppe und nur ein Proband mit einer Schalleitungsschwerhörigkeit in der Immunfluoreszenz (Tabelle 2). Kein

Proband mit positiver Reaktion in der Immunfluoreszenz zeigte eine positive T-Zell-Proliferation (Tabelle 2).

Tab. 2 Serologische Ergebnisse (indirekte Immunfluoreszenz) bezogen auf verschiedene Gruppen der Schwerhörigkeit

Probanden-Gruppe	Anzahl Probanden (% der jeweiligen Gruppe)	
	in jeweiliger Gruppe	mit positiver IIF
Probanden gesamt	136	10 (7,4%)
Normales Gehör	49	1 (2,0%)
Schwerhörigkeit gesamt	87	9 (10,3%)
SNHL 41+ dBHL	38	6 (15,8%)
SNHL 21-40 dBHL	27	2 (7,4%)
Schalleitungsstörung	22	1 (4,5%)

SNHL= Sensorineural hearing loss (Schallempfindungsschwerhörigkeit), IIF= indirekte Immunfluoreszenz

Untersucht man Sensitivität und Spezifität der Audiometrie-Resultate in Bezug zu den Ergebnissen der indirekten Immunfluoreszenz, indem man bei Personen mit durchgemachter Lassa-virus-Infektion von einer Schallempfindungsschwerhörigkeit ≥ 41 dBHL (SNHL 41+) ausgeht, erhält man die folgende Treffergenauigkeiten:

Tab. 3 Treffergenauigkeit von Lassa-Fällen durch audiometrische Diagnostik

	SNHL 41+ = "Lassa Fall"	Normales Gehör = "kein Lassa Fall"
IIF positiv	6 (richtig positive)	1 (falsch negative)
IIF negativ	32 (falsch positive)	48 (richtig negative)

Daraus ergeben sich folgende statistische Beziehungen für die Treffergenauigkeit von Personen mit Markern einer durchgemachten Lassavirus-Infektion durch audiometrische Diagnostik:

- Sensitivität: $6 / 6+1 = 85.7 \%$
- Spezifität: $48 / 48 + 32 = 60 \%$
- Positiver Vorhersagewert: $6 / 6 + 32 = 15.8 \%$
- Negativer Vorhersagewert: $48 / 48+ 1 = 97.6 \%$

Bei einem Vergleich der Gruppen „SNHL 41+“ mit „SNHL 21-40“ sowie der Gruppe „Normales Gehör“ unter Anwendung des Mantel-Haenszel Chi-Square Tests für Trend ergibt sich eine signifikante Korrelation ($p=0,019$) zwischen der höhergradigen Schallempfindungsschwerhörigkeit (SNHL 41+) und der indirekten Immunfluoreszenz als serologischem Marker einer Lassavirus-Infektion.

Schlussfolgerungen:

Es ergibt sich eine signifikante Korrelation ($p=0,019$) zwischen dem Schweregrad der sensorineuralen Schwerhörigkeit in einem Lassa-Niedrigprävalenzgebiet Guineas und Antikörpern einer durchgemachten Lassavirus-Infektion. Der positive Vorhersagewert (15,8%) eines „audiometrischen Screenings“ ist zu gering, um Personen mit Markern einer durchgemachten Lassavirus-Infektion zu identifizieren.

4.2.2 T-Zell-Proliferation

Die Messung der T-Zell-Proliferation wurde nach Stimulation der gewonnenen PBMC mit Lassavirus-Antigenen durchgeführt. Neben den rekombinanten Lassavirus-Proteinen GP-2 und NP wurde ein „Pool“ aus drei hochkonservierten Peptiden, abgeleitet von der Sequenz des ungespaltenen Vorläuferproteins GP-C, verwendet. Als Positivkontrolle dienten PHA, worauf alle Probanden eine positive T-Zell-Proliferation zeigten, sowie PPD und ein Gelbfieber-Impfvirus (Tabelle 4).

Tab. 4 T-Zell-Proliferation bezogen auf verschiedene Gruppen der Schwerhörigkeit

Probanden-Gruppe	Anzahl Probanden	Anzahl (% der jeweiligen Gruppe) Probanden mit positiver T-Zell-Proliferation nach Antigen-Stimulation mit				
		PPD	GP-2	NP	PP	YFV
Probanden gesamt	136	98 (72,1)	6 (4,4)	6 (4,4)	3 (2,2)	8 (5,9)
normales Gehör	49	37 (75,5)	1 (2,0)	0 (0)	1 (2,0)	4 (8,2)
Schwerhörigkeit gesamt	87	61 (70,1)	5 (5,7)	6 (6,9)	2 (2,3)	4 (4,6)
SNHL 41+ dBHL	38	30 (78,9)	4 (10,5)	5 (13,2)	1 (2,6)	1 (2,6)
SNHL 21-40 dBHL	27	15 (55,6)	1 (3,7)	1 (3,7)	0 (0)	1 (3,7)
Schalleitungsstörung	22	16 (72,7)	0 (0)	0 (0)	1 (4,5)	2 (9,1)

SNHL= Sensorineural hearing loss (Schallempfindungsschwerhörigkeit), PPD= Purified Protein Derivate (Tuberkuline), GP-2= Lassavirus Glykoprotein 2, NP= Lassavirus Nukleoprotein, PP= Lassavirus Glykoprotein-Peptid-Pool, YFV= yellow fever-virus (17D Gelbfieberimpfvirus)

Die fünf Schwerhörigen mit signifikanter T-Zell-Proliferation auf GP-2 haben alle eine Schallempfindungsschwerhörigkeit, hiervon fallen vier Schwerhörige in die Gruppe „Moderate bzw. Severe hearing loss“ (Hörschwelle 41+ dBHL). Alle fünf Schwerhörigen mit signifikanter T-Zell-Proliferation auf GP-2 zeigten auch eine signifikante T-Zell-Proliferation auf NP. Die sechs Schwerhörigen mit

signifikanter T-Zell-Proliferation auf NP haben alle eine Schallempfindungsschwerhörigkeit, hiervon fallen fünf Schwerhörige in die Gruppe „moderate bzw. severe hearing loss“ (Hörschwelle 41+ dBHL).

Kein Proband mit positiver T-Zell-Proliferation zeigte eine positive Reaktion in der indirekten Immunfluoreszenz.

Bei einem Vergleich der Gruppen „SNHL 41+“ mit „SNHL 21-40“ sowie der Gruppe „Normales Gehör“ unter Anwendung des Mantel-Haenszel Chi-Square Tests für Trend ergibt sich eine signifikante Korrelation ($p=0,007$) zwischen der höhergradigen Schallempfindungsschwerhörigkeit (SNHL 41+) und der T-Zell-Proliferation auf NP. Die Korrelation der höhergradigen Schallempfindungsschwerhörigkeit mit der T-Zell-Proliferation auf GP-2 ist mit einem p-Wert von 0,85 nicht signifikant.

Schlussfolgerung:

Es gibt eine signifikante Korrelation ($p=0,007$) zwischen dem Schweregrad von Schallempfindungsschwerhörigkeit in einem Lassa-Niedrigprävalenzgebiet Guineas und der T-Zell-Proliferation nach Stimulation mit dem Lassavirus-Antigen NP.

4.3 Zytokinmessung (IFN-gamma)

Zur Bestimmung der IFN-gamma Produktion wurden PBMC von 52 Probanden mittels Elispot-Verfahren untersucht. Die PBMC wurden analog zu den T-Zell-Proliferationen mit den Lassavirus-Antigenen GP-2 und NP, sowie einem „Pool“ aus drei hochkonservierten Peptiden des ungespaltenen Vorläuferproteins GP-C stimuliert. Als Positivkontrolle dienten PHA, PPD und ein Gelbfieber-Impfvirus (Tabelle 5).

Tab. 5 IFN-gamma Detektion im Elispot-Verfahren

Probanden-Gruppe	Anzahl positiv/ insgesamt getestete Probanden (% Positive der jeweils getesteten Probanden) nach Antigen-Stimulation mit					
	PHA	PPD	GP-2	NP	PP	YFV
Probanden gesamt	48/52 (92)	37/52 (71)	29/52 (56)	19/48 (34)	30/52 (58)	21/52 (40)
normales Gehör	16/16 (100)	11/16 (69)	6/16 (38)	4/15 (27)	8/16 (50)	4/16 (25)
Schwerhörigkeit gesamt	32/36 (89)	26/36 (72)	23/36 (64)	15/33 (41)	22/36 (61)	17/36 (47)
SNHL 41+ dBHL	18/20 (90)	15/20 (75)	12/20 (60)	8/18 (44)	13/20 (65)	8/20 (40)
SNHL 21-40 dBHL	8/10 (80)	8/10 (80)	7/10 (70)	6/9 (67)	7/10 (70)	7/10 (70)
Schalleitungsstörung	5/5 (100)	3/5 (60)	4/5 (80)	1/5 (20)	2/5 (40)	2/5 (40)

SNHL= Sensorineural hearing loss (Schallempfindungsschwerhörigkeit), PHA= Phytohämagglutinin, PPD= Purified Protein Derivate (Tuberkuline), GP-2= Lassavirus Glykoprotein 2, NP= Lassavirus Nukleoprotein, PP= Lassavirus Glykoprotein-Peptid-Pool, YFV= yellow fever-virus (17D Gelbfieberimpfvirus)

Die im Elispot ermittelte IFN-gamma-Produktion zeigt keine Korrelation mit der Schwerhörigkeit der Probanden. Bei den Probanden mit sensorineuraler

Schwerhörigkeit ist im Vergleich zur Kontrollgruppe allerdings eine generell stärkere Reaktion auf alle Antigene zu beobachten.

Schlussfolgerung:

Es gibt keine Korrelation zwischen Schallempfindungsschwerhörigkeit in einem Lassa-Niedrigprävalenzgebiet Guineas und der IFN-gamma-Produktion nach T-Zell-Stimulation mit Lassavirus-Antigenen.

3.4 Deskriptive Epidemiologie

Insgesamt wurden 100 Probanden gefunden, bei denen anamnestisch eine Hörminderung erstmals während oder nach einer fieberhaften Erkrankung aufgetreten ist. Zu diesen Probanden wurden passend nach Alter und Geschlecht im selben Dorf Kontroll-Personen ohne Hördefizite gesucht. Letztendlich wurden 136 Probanden aus 19 Dörfern in die Studie eingeschlossen. Nach Auswertung der Audiometriedaten zeigte sich, dass 25 von 68 Kontroll-Personen (37%) mit anamnestisch normalem Hörvermögen auch in die Gruppe der Schwerhörigen fallen. Die Häufigkeit von Schwerhörigkeit war mit 20% in dem Dorf Kawossou am höchsten. Die Anzahl der Probanden in den jeweiligen Dörfern mit Bezug auf positive Lassa-Marker sowie den Grad der Schwerhörigkeit finden sich in Tabelle 6.

Tab. 6 Deskriptive Epidemiologie

Ort/Distrikt	Anzahl Einwohner	Gehör normal	SH gesamt	SNHL 41+/21-40/SLS	IIF (T-Zell GP2/NP) positiv	Lassamarker positiv (% der SH)
Bamba	655	4	15	10 / 3 / 2	3 (2 / 2)	5 (33)
Dari	45	1	1	0 / 0 / 1	0 (0 / 0)	0 (0)
Dembaya	2663	1	2	0 / 0 / 1	0 (0 / 0)	0 (0)
Faladjan	122	2	4	2 / 2 / 0	0 (0 / 0)	0 (0)
Gambobo	100	1	1	0 / 1 / 0	0 (0 / 0)	0 (0)
Ganganta	480	1	0	0 / 0 / 0	0 (0 / 0)	0 (0)
Gbéréyiré	270	5	2	2 / 0 / 0	0 (0 / 0)	0 (0)
Guèmètedé	115	1	0	0 / 0 / 0	0 (0 / 0)	0 (0)
Kaléyiré	308	1	4	3 / 1 / 0	0 (1 / 1)	1 (25)
Kanagban	858	4	3	1 / 0 / 2	0 (1 / 0)	1*
Kawossou	108	6	22	7 / 10 / 5	1 (0 / 0)	1 (5)
Khonia	110	0	1	0 / 1 / 0	0 (0 / 0)	0 (0)
Kinsibourou	305	3	3	0 / 1 / 2	0 (0 / 0)	0 (0)
Konfonya	2594	3	3	3 / 0 / 0	0 (1 / 2)	2 (67)
Koubiya	920	2	9	5 / 2 / 2	1 (0 / 0)	1 (11)
Lagbè	52	0	1	1 / 0 / 0	1 (0 / 0)	1 (100)
Samayah	822	7	8	3 / 2 / 3	2 (1 / 1)	2 (13)**
Wotokholou	1455	2	4	0 / 3 / 1	1 (0 / 0)	1 (25)
Yafrayah	822	5	4	1 / 0 / 3	1 (0 / 0)	1 (25)
Total	12804	49	87	38 / 27 / 22	10 (6 / 6)	16 (16)***

SNHL= Sensorineural hearing loss (Schallempfindungsschwerhörigkeit), SH= Schwerhörigkeit, SLS= Schalleitungsschwerhörigkeit, IIF= indirekte Immunfluoreszenz, T-Zell GP2/NP= T-Zell-Proliferation auf Lassavirus Glykoprotein 2 bzw. Lassavirus Nukleoprotein, Lassamarker= IIF und T-Zell GP2/NP zusammen

* dieser Proband hat ein normales Gehör

** ein Proband hat ein normales Gehör, deshalb bezieht sich die %-Angabe nur auf einen Lassamarker positiven Probanden

*** zwei Probanden haben ein normales Gehör, deshalb bezieht sich die %-Angabe nur auf 14 Lassamarker positive Probanden

5 Diskussion

Ziel der Arbeit war

- (1) die Prävalenz von immunologischen Lassa-Markern bei Personen mit Schallempfindungsschwerhörigkeit zu ermitteln, um die Bedeutung dieser Infektion für Schwerhörigkeit in einem Lassa-Niedrigprävalenzgebiet abschätzen zu können.
- (2) eine mögliche Korrelation des Schweregrades der Schallempfindungsschwerhörigkeit mit immunologischen Markern einer Lassavirus-Infektion zu ermitteln.
- (3) den positiven Vorhersagewert einer einfachen audiometrischen Untersuchung zur Identifikation von Personen mit durchgemachter Lassavirus-Infektion zu ermitteln.

5.1 Wahl des Studiengebietes

Zur Durchführung der Studie wurde die Region Bouramaya gewählt, welche sich in der Nähe der Hauptstadt Conakry befindet. Die im Südosten Guineas liegende Region mit der höchsten Lassa-Prävalenz des Landes (Lukashevich et al., 1993) stellte aufgrund von jahrelangen Bürgerkriegen ein zu großes Sicherheitsrisiko dar. Außerdem war ein nahe gelegenes Studiengebiet notwendig, da die Probanden zur Lymphozyten-Spende in die Labors des PFHG geholt werden mussten. Für die optimale Konservierung der Lymphozyten ist ein unmittelbares Separieren und Einfrieren der PBMC nach Blutentnahme entscheidend. Aufgrund der hierzu benötigten labortechnischen Anforderungen wäre diese Untersuchung in keiner anderen Region Guineas möglich gewesen. Deshalb haben wir uns, trotz der verglichen mit anderen Regionen Guineas geringeren Lassa-Prävalenz, für die Region Bouramaya entschieden.

5.2 Qualität und Ergebnisse des Audiometrischen Screenings

Das audiometrische Screening wurde mit einem tragbaren Audiometer in den Dörfern der Probanden durchgeführt. Hierzu wurde jeweils der ruhigste Ort, meist außerhalb des Dorfes gewählt und die Audiometrie im Geländewagen durchgeführt. Der Untersuchungsort wurde subjektiv gewählt, da die Messung des Umgebungsschalls aus technischen Gründen nicht durchgeführt werden konnte. Ebenso wenig war die Möglichkeit der Vertäubung gegeben, so dass bei einigen Probanden mit höhergradiger monauraler Schwerhörigkeit nicht auszuschließen ist, dass aufgrund der Schallweiterleitung über den Schädelknochen nach kontralateral eine bessere Hörschwelle für das betreffende Ohr vorgetäuscht wurde.

Für die Klassifizierung der Schwerhörigkeit aufgrund von Hörschwellenmessungen gibt es kein universelles Schema (Roeser, 2000). Viele Autoren bilden mittlere Hörschwellen (PTA) für drei bis vier Frequenzen im Bereich des Sprachverstehens (AMA, 1979; Roeser, 2000; Hall, 2001; WHO, 2002). Die Einteilung bekommt dann im Regelfall die Schweregrade „mild/slight“ (ab 20-25dBHL), „moderate“ (ab 41dBHL), „severe“ (ab 61dBHL) und „profound“ (ab 81dBHL), wobei die genauen Grenzen bei den verschiedenen Autoren leicht variieren. Letztendlich habe ich mich für die im Methodenteil nach Hall (2001) dargestellte Klassifizierung der „American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery“ entschieden.

Die Einteilung in Schallempfindungs- und Schalleitungsschwerhörigkeit sollte einfachen Feldstudien in Afrika gerecht werden und möglichst ohne großen technischen Aufwand durchführbar sein. Aus diesem Grunde wurde zunächst auf die Messung der Knochenleitung verzichtet (tragbare Audiometer mit Knochenleitung sind zudem viel teurer) und die Einteilung nach otoskopischer Untersuchung sowie Stimmgabeltests durchgeführt. Streng genommen setzt die Definition von Schallempfindungs- bzw. sensorineuraler Schwerhörigkeit eine pathologische Hörschwelle der Luft- und Knochenleitung mit einer Differenz von höchstens 10dBHL voraus (Roeser, 2000). Da diese Definition wegen der fehlenden Messung der Knochenleitung in dieser Studie nicht erfüllt wurde,

kann man streng genommen nur von einer orientierenden Einteilung in Schalleitungs- und Schallempfindungsschwerhörigkeit sprechen. Ein monauraler Vergleich von Luft- und Knochenleitung mit dem Rinne-Test kann zwei diagnostische Probleme hervorrufen. Erstens kann bei monauraler Schwerhörigkeit eine Weiterleitung des Signals über das Mastoid auf das gesunde Ohr eine nicht vorhandene Schalleitungsstörung vortäuschen. Zweitens kann nicht genau differenziert werden zwischen reiner Schallempfindungsschwerhörigkeit und kombinierter Schwerhörigkeit. Bei 31 Schwerhörigen wurde nachträglich die Hörschwelle der Knochenleitung in Conakry ermittelt, um zu prüfen, ob die Gruppenzuordnung in Schalleitungs- und Schallempfindungsschwerhörigkeit korrekt durchgeführt wurde. Eine reine Schallempfindungsschwerhörigkeit zeigten 12 Probanden, eine Schalleitungsschwerhörigkeit zeigten sechs Probanden, passend zur Zuordnung mittels Stimmgabeltests. Bei 13 Personen mit primär diagnostizierter Schallempfindungsstörung zeigte sich bei Vergleich von Luft- und Knochenleitung eine Differenz von mehr als 10dBHL, also einer kombinierten Schwerhörigkeit. Die primäre Zuordnung wurde dennoch belassen, da zum einen bei diesen Personen ein Großteil der Hörstörung dennoch sensorineuraler Genese war, zum anderen ein einfaches Screening ohne Bestimmung der Knochenleitung im Studiendesign vorgesehen war.

5.3 Serologie

Die klassische Methode zur Diagnostik von Lassafieber-Patienten stellt die indirekte Immunfluoreszenz zur Detektion von IgM und IgG dar (McCormick et al., 1987b; Wulff and Lange, 1975). Antikörper sind bei akut Lassa-Erkrankten zum Zeitpunkt der Vorstellung im Krankenhaus nur in 50% nachweisbar (Johnson et al., 1987), werden aber in den Wochen danach zunehmend positiv. Bei bis zu 88% der Patienten sind etwa 3 - 4 Monate nach der akuten Krankheitsphase spezifische Antikörper nachweisbar (Jahrling und Peters, 1986; Tomori et al., 1987). IgM Lassa-Antikörper können bis zu etwa 1 ½ Jahren, IgG-Antikörper bis zu etlichen Jahren nach primärer Infektion

persistieren (Niklasson et al., 1984). Die Sensitivität eines ELISA (IgM-Detektion) in der Diagnostik einer akuten Lassavirus-Erkrankung ist höher als die Sensitivität der indirekten Immunfluoreszenz, besonders wenn Antigen und Antikörper im ELISA parallel getestet werden (Bausch et al., 2000). Zur Identifikation von Personen mit durchgemachter Lassavirus-Infektion, einschließlich der erst kürzlich Infizierten, stellt die indirekte Immunfluoreszenz aber eine brauchbare Methode dar (Bausch et al., 2000). Für diese Studie, bei der Personen mit durchgemachter Lassavirus-Infektion diagnostiziert werden sollten, war daher die IIF zur Bestimmung spezifischer Antikörper angebracht. Bei der von uns verwendeten Methode der internen Positivkontrolle und einer Serumverdünnung von 1:20 ist die Rate falsch-positiver Ergebnisse niedriger als im ELISA (ter Meulen, persönliche Kommunikation). Ein Teil der Personen mit Zustand nach Lassavirus-Infektion wird nicht durch die IIF erfasst. Hierfür verantwortlich ist die Tatsache, dass pro Jahr etwa 6% der seropositiven Probanden serorevertieren (McCormick et al., 1987b). Aus diesem Grund wurde als weiterer Marker einer durchgemachten Lassavirus-Infektion die T-Zell-Proliferation nach Stimulation mit Lassavirus-Antigenen durchgeführt (ter Meulen et al., 2000). In dieser Studie wurde gezeigt, dass die CD4 T-Zell-Antwort auch drei Jahre nach Seroreversion noch messbar bleibt.

Die Ergebnisse der Serologie unserer Untersuchungsgruppe passen zu den in der Literatur genannten Seroprävalenzdaten. Lukashevich et al. zeigten 1993, dass es sich in der Küstenregion Guineas um ein Niedrigprävalenzgebiet mit Seroprävalenzen zwischen 3,8% - 4,9% handelt. Bausch et al. (2001) gehen sogar von einer noch geringeren Lassa-Prävalenz aus, wobei es sich hier nicht um eine klassische Prävalenzstudie, sondern um eine Untersuchung von Lassaverdachtsfällen und anderen fieberhaften Erkrankungen handelte. Bei unserer Studie zeigten 10 von 136 Personen eine positive Reaktion in der IIF, dies entspricht einer Seropositivität von 7,4%. Da die Auswahl der Probanden durch die Suche nach Schwerhörigen schon die Wahrscheinlichkeit erhöhte, Probanden mit durchgemachter Lassavirus-Infektion ausfindig zu machen, ist die, verglichen mit der Seroprävalenzstudie von Lukashevich et al. (1993), etwas höhere Seroprävalenz nachvollziehbar. Bei Betrachtung der 38 Personen

der Gruppe „Schallempfindungsschwerhörigkeit 41+“ liegt die Seropositivität mit sechs IIF-positiven Personen bei 15,8%.

5.4 T-Zell-Proliferation

Die Kontrolle der Lassa-Virusreplikation durch den Wirt geschieht hauptsächlich durch die T-Zell-Antwort, während Antikörper bei der Neutralisation des Virus keine große Rolle spielen (Jahrling et al., 1985a; Kamperschroer und Quinn, 1999; ter Meulen et al., 1999). Kamperschroer und Quinn zeigten 1999, dass sich Menschen von einer akuten Lassafieber-Erkrankung ohne messbare neutralisierende Antikörper-Antwort erholen. Ter Meulen et al. zeigten 2000, dass sowohl Lassavirus-Antikörper positive als auch serorevertierte Personen aus einem Lassa-Endemiegebiet starke T-Zell-Antworten gegen das Lassa-Antigen NP aufweisen. Da etwa 6% der Personen pro Jahr serorevertieren (McCormick et al., 1987b), ist die Bestimmung der T-Zell-Proliferation nach Stimulation mit Lassavirus-Antigenen eine Methode zum Nachweis einer durchgemachten Lassavirus-Infektion, auch bei seronegativen Personen.

Die fünf Probanden mit positiver T-Zell-Antwort auf NP, von denen vier auch auf GP-2 signifikant proliferierten, zeigten allerdings keine positive Reaktion in der Immunfluoreszenz. Der Grund dafür könnte sein, dass die Probanden mit positiver T-Zell-Proliferation bereits serorevertiert sind. Betrachtet man allerdings die Probanden mit positiver Immunfluoreszenz, würde man annehmen, dass zumindest ein Teil auch bei der T-Zell-Stimulation proliferieren müsste. Eine mögliche Erklärung wäre, dass in der Immunfluoreszenz kreuzreagierende Lassa-Antikörper gemessen wurden, im T-Zell-Assay jedoch nur spezifische Aktivität gegen Lassa-Stämme, die dem Josiah-Stamm aus Sierra Leone (von dem die rekombinanten Proteine abgeleitet sind) ähnlich sind.

Bei der T-Zell-Proliferation auf die Antigene PPD, PP und YFV besteht keine Korrelation mit der Schwerhörigkeit. Der Anteil der Probanden mit positiver T-Zell-Proliferation auf die Tuberkulin-Antigene (PPD) ist etwas geringer als die von der WHO (2005) veröffentlichte BCG-Impfquote Guineas von 78%. Dies

könnte an einer, verglichen mit größeren Städten, geringeren Impfrate in einem ländlichen Gebiet liegen. Gelbfieber tritt in Guinea immer wieder in Epidemien auf und eine Impfung ist mittlerweile im Impfkalendar vorgesehen, wobei noch keine Schätzungen zur Durchimpfungsrate vorliegen (WHO 2005). In dem Untersuchungsgebiet Bouramaya wurden bisher keine Gelbfieber-Massenimpfungen durchgeführt (ter Meulen, persönliche Kommunikation), weshalb eine positive T-Zell-Proliferation bei nur acht Personen bzw. 5,9% der Probanden nachvollziehbar ist.

5.5 Elispot Assays

Die Bestimmung des Zytokins IFN-gamma mittels Elispot nach Stimulation von PBMC mit Lassavirus-Antigenen dient als Möglichkeit CD4 und CD8 memory T-Zellen nachzuweisen. Dies ist nach durchgemachter Lassavirus-Infektion als Ausdruck zellulärer Immunität zu erwarten (ter Meulen et al., 2000; ter Meulen et al., 2004). Die im Elispot ermittelte IFN-gamma-Produktion zeigt keine signifikante Korrelation mit der Schwerhörigkeit der Probanden. Allerdings gab es eine generell erhöhte Aktivität der Schallempfindungsschwerhörigen gegen alle Antigene.

5.6 Deskriptive Epidemiologie

Die Auswahl der 22 Dörfer in dem Untersuchungsgebiet Bouramaya geschah durch eine zufällige Stichprobe. In den Dörfern wurde dann gezielt nach Personen gesucht, die eine Schwerhörigkeit während oder nach einer fieberhaften Erkrankung entwickelt hatten. Die Auswahl der Probanden in den Dörfern diente somit nicht zur Gewinnung einer repräsentativen Stichprobe. Außerdem waren nur Probanden, die z.B. nicht gerade zur Arbeit auf dem Feld oder in anderen Regionen beschäftigt waren, für die Studie zu gewinnen. Aus den genannten Gründen kann keine genaue Angabe zur Häufigkeit von Taubheit in der Allgemeinbevölkerung bzw. keine Korrelation mit allen Ertaubten in einem Dorf erfolgen. Trotzdem zeigt die Untersuchung, dass

Schwerhörigkeit generell ein großes Problem darstellt. In dem Dorf Kawossou beispielsweise hat möglicherweise jeder fünfte Einwohner eine Schwerhörigkeit. Von den Kontrollpersonen, die angaben ein normales Hörvermögen zu haben, stellte sich nach der Audiometrie bei 25 von 68 Personen (37%) heraus, dass diese ebenfalls eine Hörminderung hatten. Bei 7 Personen handelte es sich hierbei sogar um eine Schwerhörigkeit im Bereich „moderate hearing loss“ mit mittleren Hörschwellen zwischen 41-61dBHL. Ursache hierfür könnte eine eingeschränkte Wahrnehmung des eigenen Gesundheitszustandes sein.

5.7. Schwerhörigkeit und Marker einer Lassainfektion

Die Region Bouramaya, in dem unsere Untersuchung stattfand, liegt in der Küstenregion Guineas. Hier wurden die folgenden Studienergebnisse ermittelt:

- (1) Es wurde die Prävalenz von immunologischen Lassa-Markern bei Personen mit Schallempfindungsschwerhörigkeit ermittelt, um die Bedeutung dieser Infektion für Schwerhörigkeit in einem Lassa-Niedrigprävalenzgebiet abschätzen zu können. Eine Seropositivität in der indirekten Immunfluoreszenz zeigten 15,8%, eine positive T-Zell-Proliferation 13,2% der Probanden mit mittel- bis hochgradiger sensorineuraler Schwerhörigkeit.
- (2) Es wurde der Zusammenhang des Schweregrades der Schallempfindungsschwerhörigkeit mit immunologischen Markern einer Lassavirus-Infektion untersucht. Hierbei zeigte sich eine signifikante Korrelation zwischen dem Schweregrad von sensorineuraler Schwerhörigkeit mit Antikörpern einer durchgemachten Lassavirus-Infektion ($p=0,019$) sowie mit der T-Zell-Proliferation nach Stimulation mit dem Lassavirus-Antigen NP ($p=0,007$).
- (3) Der positive Vorhersagewert einer einfachen audiometrischen Untersuchung zur Identifikation von Personen mit durchgemachter Lassavirus-Infektion ist mit 15,8% sehr gering.

Im Folgenden sollen die genannten Studienergebnisse diskutiert werden:

(1) Prävalenz von immunologischen Lassa-Markern bei Personen mit Schallempfindungsschwerhörigkeit

Unsere Untersuchung ergab eine Häufigkeit von positiven Lassa-Markern in 15,8% (indirekte Immunfluoreszenz) bzw. 13,2% (T-Zell-Proliferation) der Personen mit mittel- bis hochgradiger sensorineuraler Schwerhörigkeit. Demgegenüber zeigten Personen mit normalem Hörvermögen in maximal 2% eine positive Reaktion in der indirekten Immunfluoreszenz bzw. in der T-Zell-Proliferation. Aufgrund des Bias der Patientenauswahl sind diese Häufigkeiten wahrscheinlich nicht repräsentativ für die gesamte Bevölkerung. Sie zeigen aber, dass Lassafieber eine kausale Bedeutung in der Entstehung von sensorineuraler Schwerhörigkeit zukommt und somit ein wichtiges Gesundheitsproblem darstellt. Auch Cummins et al. zeigten 1990, allerdings in einem Lassa-Hochprävalenzgebiet in Sierra Leone, eine Antikörperprävalenz (Immunfluoreszenz) in 81% der Personen, die eine plötzlich aufgetretene Schwerhörigkeit im Zusammenhang mit einer fieberhaften Erkrankung erlitten hatten. Die Seropositivität bei der Kontrollgruppe betrug 19%. Cummins et al. (1990) zeigten ferner, dass die Prävalenz einer sensorineuralen Schwerhörigkeit in einem Lassa-Endemiegebiet bei seropositiven Personen bei 17,6% liegt.

In der Literatur finden sich bezüglich der Ätiologie von postnatal erworbener sensorineuraler Schwerhörigkeit viele Hypothesen, wie viral bedingte Entzündungen, Gefäßerkrankungen, allergische Reaktionen, Ruptur intralabyrinthärer Membranen, lokale Histaminproduktion und autoimmunologische Erkrankungen (Ciufetti, 1991; Fettermann, 1996). Virale Infektionen werden von vielen Autoren als wichtigste Ursache von SNHL betrachtet (Jaffe, 1978; Veltri et al., 1981; Wilson et al., 1983; Sando, 1977; Schuhknecht und Donovan, 1986). Die häufig im Zusammenhang mit SNHL identifizierten Viren in Industrieländern sind Mumps, Röteln, Varicella zoster und das Cytomegalie-Virus (Wilson et al., 1983). Berrocal und Ramirez-

Camacho (2002) teilen die möglichen Ursachen für idiopathisch bedingte SNHL in vier Gruppen ein: viral, vaskulär, Ruptur intralabyrinthärer Membranen und immunvermittelt. Oft sind die Ursachen nicht klar zu trennen, virale Infektionen beispielsweise können autoimmunologische und vaskuläre Reaktionen hervorrufen. In den meisten Fällen ist die Ätiologie der sensorineuralen Schwerhörigkeit ungeklärt (Koc und Sanisoglu, 2003), nur in etwa 25% der Fälle kann eine Ursache ermittelt werden (Yoon et al., 1990).

Tab. 7 Ursachen sensorineuraler Schwerhörigkeit

(nach Berrocal und Ramirez-Camacho, 2002: Common causes of sudden sensorineural hearing loss)

Kochleäre Ursachen

Infektiöse Ursachen: viral (Mumps, Röteln, Masern, Zytomegalie-Virus, Herpesviren: simplex, Varicella zoster, Epstein-Barr), Syphilis, Mycoplasma pneumoniae, Lyme-Borreliose, Toxoplasmose

Traumatische Ursachen: Frakturen des Os temporale, Operationen, Dekompensationskrankheit, Erschütterungstrauma, perilymphatische Fistel, Lumbalpunktion

Zirkulatorische Ursachen: Buerger Syndrom, Kardiopulmonärer Bypass, Sichelzellanämie, Leukämie, vertebrobasiläre Durchblutungsstörung, Mitochondriopathie, Erythrozytendefekte, Myelom

Systemische Autoimmunerkrankungen: Polyarteriitis nodosa, Cogan-Syndrom, systemischer Lupus erythematosus, rheumatoide Arthritis, Wegener-Granulomatose, rezidivierende Polychondritis, Arteriitis temporalis, Dermatomyositis, Polymyositis, Sklerodermie, endolymphatischer Hydrops, Morbus Menière

Metabolische Ursachen : Nierenversagen, Diabetes mellitus, Hypothyreoidismus

Ototoxizität: Aminoglykosid-Antibiotika, Schleifendiuretika, Salicylate, nichtsteroidale Antiphlogistika, Vancomycin, Erythromycin, Azithromycin, orale Kontrazeptiva, Interferon, Chinin und Derivate, Cisplatin

Retrochleäre und zentralnervöse Ursachen

Meningitis

Sarkoidose

Multiple Sklerose

Amyotrophe Lateralsklerose

Friedreich-Ataxie

Guillain-Barré Syndrom

Vogt-Koyanagi-Harada-Syndrom

Xeroderma pigmentosa

Tumoren: Akustikusneurom, karzinomatöse Neuropathie, Metastasen im Kleinhirnbrückenwinkel

Zentrale Taubheit: Wallenberg-Syndrom, kortikale Enzephalitis, Morbus Alzheimer

Bezüglich der Ätiologie von Schwerhörigkeit gibt es in Afrika nur wenige wissenschaftliche Untersuchungen, obwohl Schwerhörigkeit in Entwicklungsländern schon lange als eine Hauptursache von Körperbehinderung und Benachteiligung bekannt ist (WHO, 1991; Wilson 1990; Holborow, 1985). Nach Schätzungen der WHO (2002) leiden weltweit 250 Millionen Menschen unter Schwerhörigkeit (PTA > 40dBHL im besseren Ohr). Damit ist Schwerhörigkeit die zweithäufigste Ursache des Indikators „Years Lived with a Disability (YLD)“, der die Zeit misst, die ein Betreffender aufgrund einer Krankheit leidet. 2/3 der Schwerhörigen leben in Entwicklungsländern, etwa die Hälfte der Hörstörungen werden als vermeidbar angesehen (WHO, 2002). Den Grund für chronische Otitis media als häufigste Ursache von Schwerhörigkeit in Entwicklungsländern sieht Wilson (1990) in der Vernachlässigung dieser Erkrankung.

Die wenigen Untersuchungen zu Schwerhörigkeit in Afrika beziehen sich vornehmlich auf das Kindesalter. Untersuchungen von Westerberg et al. (2005) ergaben eine Prävalenz von 2,4% Schwerhörigkeit (135 von 5528 Schulkinder mit einer Hörschwelle von >30 dBHL in mindestens einer der Testfrequenzen 0,5; 1; 2; 4 kHz) bei Schulkindern in Simbabwe. Eine Schallempfindungsschwerhörigkeit hatten 41,5%, eine Schalleitungsschwerhörigkeit 58,1%. Als Ursachen für die Schallempfindungsschwerhörigkeit nennen Westerberg et al. (2005) Infektionen in 29% (Otitis media 11%, Mumps 7%, Masern 3,5%; Meningitis 3,5%; andere 3,5%), genetische Ursachen in 18%, nicht-infektiöse Ursachen in 7% (Behandlung Tbc, Geburtsverzögerung, Hyperbilirubinämie, Trauma), in 46% bleibt die Ätiologie unklar. Holborow et al. (1982) nennen Masern, Meningitis und Röteln als die drei Hauptursachen von vermeidbarer Schwerhörigkeit, belegt durch eine Untersuchung an 800 Kindern in Nigeria. Eine Untersuchung zur Prävalenz und zu Risikofaktoren von Hörstörungen an 2015 Kindern aus Sierra Leone sieht chronische Otitis media als Haupt-Risikofaktor von Schwerhörigkeit an (Seely et al., 1995). Als weitere Risikofaktoren werden Masern, Mumps, Bewusstlosigkeit, Traumen mit Trommelfellperforation, Chinintherapie, positive Familienanamnese bezüglich Taubheit,

Schwangerschafts- und Geburtskomplikationen genannt. Auch Lassafieber wird als Ursache erwähnt, wobei laut Seely et al. (1995) der Einfluss aufgrund vieler subklinischer Infektionen nicht abschätzbar sei.

Bezüglich der von uns untersuchten Personen mit Schallempfindungsschwerhörigkeit kommen neben einer Lassavirus-Infektion alle oben genannten postnatalen Ursachen in Frage, welche mit einer fieberhaften Erkrankung einhergehen. Hierzu gehören auch Infektionen mit den oben genannten Erregern. Die Mumps-Impfung beispielsweise wird in Guinea nicht durchgeführt, die Masern-Impfquote liegt bei nur etwa 52% (WHO, 2005). Westerberg et al. (2005) gehen bei der Ätiologie von Schallempfindungsschwerhörigkeit in 29% von Infektionen aus, wobei Otitis media mit 11% die häufigste Ursache darstellt. Vergleicht man unsere Ergebnisse (Seropositivität in der indirekten Immunfluoreszenz zeigten 15,8%, eine positive T-Zell-Proliferation 13,2% der Probanden mit mittel- bis hochgradiger sensorineuraler Schwerhörigkeit) mit den in Ostafrika erhobenen Daten von Westerberg et al. (2005), scheint die Schlussfolgerung möglich, dass Lassa-bedingte Taubheit den häufigsten Grund einer Schallempfindungsschwerhörigkeit in den Lassa-Endemiegebieten Westafrikas darstellt. Auch Cummins et al. (1990) folgern, dass bei einem Vergleich der Häufigkeiten von postinfektiös bedingter sensorineuraler Schwerhörigkeit in Bezug auf ihre Ursache eine Lassavirus-Infektion an vorderster Stelle steht.

Eine weitere Ursache stellen Arzneimittel mit ototoxischen Nebenwirkungen dar. Die Probanden wurden nach Medikamenten befragt, es konnte aber im Allgemeinen keine genauen Auskunft über Präparate gegeben werden. So wussten Probanden zwar meist, dass sie Malaria hatten und auch Tabletten einnahmen, aber nicht den genauen Wirkstoff. Die in dem Untersuchungsgebiet Bouramaya endemisch auftretende Malaria wird medikamentös unter anderem mit Chinin therapiert, welches eine reversible Schwerhörigkeit auslösen kann (Roche et al.; 1990). Auch Antibiotika hatten viele Probanden genommen, ohne sich an den Wirkstoff zu erinnern. Ototoxische Antibiotika wie z.B. Aminoglykoside, Makrolide und Vancomycin (Lüllmann und Mohr, 1999) sind laut persönlicher Mitteilung durch Dr. Oumar Sylla in der Region verbreitet.

Weitere ototoxische Medikamente wie das Diuretikum Furosemid (Rybak, 1982) oder die mit dem Risiko von temporären Hörstörungen einhergehende Acetylsalicylsäure (Cazals, 2000), kommen nach Angaben von Dr. Oumar Sylla ebenso in der Untersuchungsregion Bouramaya zum Einsatz.

Zusammenfassend:

Wir können die Studien von Cummins et al. (1990) bestätigen, dass Lassavirus-Infektionen in einem Endemiegebiet die wichtigste Ursache erworbener sensorineuraler Schwerhörigkeit darstellt.

(2) Bedeutung der Korrelation des Schweregrades der Taubheit mit immunologischen Lassa-Markern

Unsere Daten zeigen, dass vor allem Personen mit einer mittleren bis höhergradigen sensorineuralen Schwerhörigkeit (PTA>40dBHL) immunologische Marker einer durchgemachten Lassavirus-Infektion aufweisen, während bei leichtgradiger sensorineuraler Schwerhörigkeit keine Korrelation besteht. Dies stützt die von verschiedenen Autoren vertretene Meinung einer immunologisch vermittelten Ursache für das Auftreten von Schwerhörigkeit bei Lassafieber (Cummins et al., 1990; Liao et al., 1993; McCormick und Fisher-Hoch, 2002; Rybak, 1990) und ist möglicherweise ein Hinweis auf den Zusammenhang der Schwerhörigkeit mit der Stärke der Immunantwort.

Cummins et al. (1990) gehen von einer immunvermittelten Pathogenese der Schwerhörigkeit bei Lassafieber-Patienten aus. Die Schwere der Erkrankung korreliert nicht mit der Stärke der Schwerhörigkeit, der Beginn der Ertaubung liegt in der Rekonvaleszenz, nachdem die Serokonversion stattgefunden hat und nicht in der akuten Krankheitsphase. Eine Studie von Vuori et al. (1962) zu viral bedingter Schwerhörigkeit bei Mumps unterstützt die These, dass die Stärke der Viruserkrankung nicht mit der Hörstörung korreliert. Liao et al., die 1992 die Daten von Cummins et al. (1990) mit eigenen Daten von Patienten mit SNHL verglichen, gehen ebenfalls von einer immunologisch vermittelten Schwerhörigkeit aus. Sie sehen in Virusinfektionen, die als gemeinsames

Merkmal eine immunologische Antigen-Antikörper-Antwort auslösen, eine Hauptursache für plötzlich auftretende sensorineurale Schwerhörigkeit. Auch Rybak (1990) geht von einer virusinduzierten Immunpathologie aus und bemerkt, dass das Auftreten viral bedingter plötzlicher sensorineuraler Schwerhörigkeit oftmals zeitlich mit der Serokonversion übereinstimmt.

Für eine immunologisch bedingte Ätiologie von sensorineuraler Schwerhörigkeit unklarer Genese spricht ferner der Therapieerfolg mit Steroiden. Wilson et al. zeigten bereits 1980 die Wirksamkeit einer Steroidbehandlung bei Patienten mit plötzlich aufgetretener sensorineuraler Schwerhörigkeit unklarer Genese in einer Doppelblind-Studie. Eine orale Behandlung mit dem Glukokortikoid Dexamethason über 10-12 Tage führte zu einem signifikanten Rückgang bzw. einer Minderung der Schwerhörigkeit bei Patienten mit Hörminderungen zwischen 40-90dB. Diesen Effekt führten Wilson et al. (1980) auf die anti-entzündliche Wirkung der Steroide zurück. Moskowitz et al. bestätigten 1984 Wilsons Ergebnisse. Eine Therapiestudie von Garcia-Berrocal et al. (2003) zum Vergleich der Effektivität von oraler Steroidtherapie bei SNHL unterschiedlicher Genese zeigte die beste Ansprechrage bei IMIED (Immune-mediated inner ear disease), gefolgt von viraler und vaskulärer Ursache. Trotz der zahlreich durchgeführten Untersuchungen zur Therapie sensorineuraler Schwerhörigkeit unklarer Genese gibt es aktuell noch keine standardisierten Behandlungsschemata. Dennoch sehen viele Spezialisten nach aktueller Studienlage die orale Steroidtherapie als Mittel der ersten Wahl an (Marzo, 2005; Slattery et al., 2005).

Bei der Pathogenese der Schwerhörigkeit bei Lassa-Patienten könnte eine starke, evtl. chronische und somit lang nachweisbare Immunantwort eine Rolle spielen. Die Elispot-Daten weisen möglicherweise auf eine generell erhöhte T-Zell-Aktivität der Schallempfindungsschwerhörigen hin. Eine starke CD4 T-Zell-Antwort gegen Lassa-Antigene konnte in Probanden aus endemischen Gebieten in prospektiven Studien auch drei Jahre nach Seroreversion gezeigt werden (ter Meulen et al., 2000, 2004). Der Pathologie der postulierten immunologischen Genese der Ertaubung könnten unterschiedliche Pathomechanismen zugrunde liegen: Autoimmunmechanismen gegen

Innenohr-Antigene, Endothelschädigung im Innenohr, aber auch die Infektion von Schwann'schen Zellen des Nervus vestibulocochlearis.

Cadoni et al. (2002) untersuchten bei Patienten mit immunvermittelter SNHL Anti-Endothelzell-Autoantikörper (AECA), die als Marker einer Vaskulitis gelten. Ein statistisch signifikanter Anteil der Patienten mit SNHL war AECA positiv (54%) im Vergleich zur Kontrollgruppe (14%). Ein Rückgang der Hörminderung nach Therapie mit oralen Steroiden war bei AECA negativen Patienten häufiger, als bei AECA positiven Patienten. Cadoni et al. (2002) deuten dies als Hinweis darauf, dass bei AECA positiven Patienten eine irreversible vaskuläre Endothelschädigung stattgefunden haben könnte, auch wenn AECA nicht innenohrspezifisch sind und evtl. nur ein Epiphänomen darstellen. Das bei Lasspatienten beschriebene „plasma-leakage“ ist nicht auf eine Vaskulitis zurückzuführen, es kommt aber zu einer virus- oder zytokinvermittelten Schädigung des Endothels, die zu Hypovolämie und Hypoxie führt (Fisher-Hoch, 2002). Diese Endothelschädigung könnte auch im Innenohr hervorgerufen werden und eine mögliche Ursache von SNHL bei Lasspatienten darstellen.

Günther et al. zeigten 2001, dass das Lassavirus einen ausgeprägten Neurotropismus besitzt. Rambukkana et al. zeigten 2003, dass Arenaviren (LCMV und Lassavirus) bevorzugt Schwann'sche-Zellen infizieren ohne diese zu zerstören, wohingegen Neuronen nicht infiziert werden. Dies liegt vermutlich an der hohen Dichte von α -Dystroglycan-Rezeptoren in den Zellmembranen der Schwann'schen Zellen. Des Weiteren zeigten Rambukkana et al. (2003), dass es durch eine Arenavirus-Infektion zu fehlerhafter Myelinisierung von Schwann-Zellen kommt. Fehlerhafte Myelinisierung beeinträchtigt die Nervenleitgeschwindigkeit (Scherer und Arroyo 2002) und könnte eine mögliche Ursache der Hörminderung bei Lassa-Ertaubten darstellen. Infizierte Schwann-Zellen, welche im Gegensatz zu Neuronen MHC-I Moleküle besitzen, würden von Lassa-spezifischen T-Zellen attackiert, da sie Lassa-Peptide präsentieren können. Die Infektion von Schwann'schen Zellen könnte folglich die Basis für die postulierte immunologische Genese der Ertaubung bei Lassa-Patienten darstellen.

Zusammenfassend:

Die positive Korrelation des Schweregrades der Taubheit mit immunologischen Lassa-Markern steht im Einklang mit der Hypothese einer viral ausgelöste Immunreaktion als Ursache für die Ertaubung. Immunsuppressive Therapien sollten deshalb auf ihre Wirksamkeit bei Lassafieber-bedingter Schwerhörigkeit getestet werden.

(3) Bedeutung des niedrigen positiven Vorhersagewertes der Audiometrie

Mit 15,8% ist der positive Vorhersagewert weder zur Identifikation von Individuen mit durchgemachter Lassavirus-Infektion, noch zur Identifikation von Dörfern mit erhöhter Lassa-Aktivität geeignet.

Die Ursachen für den geringen positiven Vorhersagewert liegen in der niedrigen Prävalenz von Lassa-Erkrankungen in dem Untersuchungsgebiet, an den vielen anderen Ursachen von Schallempfindungsschwerhörigkeit (Abschnitt 5.7 (1)) und daran, dass zumindest für Antikörper eine erhebliche jährliche Seroreversionsrate gezeigt wurde (Abschnitt 5.3). Unsere Daten decken sich mit den Ergebnissen anderer epidemiologischer Studien. Lukashevich et al. zeigten 1993, dass es sich in der Küstenregion Guineas um ein Niedrigprävalenzgebiet mit Lassa-Antikörperprävalenzen zwischen 3,8% - 4,9% handelt. Bausch et al. (2001) gehen sogar von einer noch geringeren Lassa-Prävalenz aus. Cummins et al. (1990) zeigten an Personen aus einer östlichen Provinz Sierra Leones, dass die Prävalenz von sensorineuraler Schwerhörigkeit bei Personen mit durchgemachter Lassavirus-Infektion bei 17,6% liegt. Des Weiteren wurde bei dieser Studie gezeigt, dass 81% der Personen mit plötzlich aufgetretener sensorineuraler Schwerhörigkeit Antikörper gegen das Lassavirus hatten, während die Seropositivität bei der Kontrollgruppe bei 19% lag. Verglichen mit der Studie von Cummins et al. (1990) war die Seroprävalenz in Bouramaya um ein vielfaches geringer, weshalb auch ein geringerer Anteil der Schwerhörigkeit auf eine Lassa-Erkrankung zurückzuführen ist. Allerdings ist das Verhältnis der Antikörper-Prävalenzen in der Fall- und Kontrollgruppe ähnlich, bei Cummins et al. (1990): $81/19 = 4$, in dieser Studie $10/2 = 5$.

5.8 Ausblick

1. Die Studie sollte in einem Lassa-Hochprävalenzgebiet wiederholt werden, um die Ergebnisse zu bestätigen oder zu widerlegen.
2. Falls sich die Ergebnisse bestätigen, könnte eine Dämpfung der Immunantwort in der frühen Rekonvaleszenz einer Lassavirus-Infektion das Auftreten einer Schwerhörigkeit eventuell verhindern. Mögliches Problem einer immunsupprimierenden Therapie mit beispielsweise Kortikoiden ist allerdings das Risiko einer persistierenden Infektion, da Arenaviren zur Persistenz neigen. Dies könnte im Affen- oder Meerschweinchenmodell untersucht werden.
3. Der Pathomechanismus der Schwerhörigkeit könnte im Affen- oder Meerschweinchenmodell durch Messung von Autoantikörpern gegen Strukturen des Innenohres einschließlich des Endothels sowie durch histopathologische Untersuchungen des Innenohres inklusive Hörnerv und Schwann-Zellen genauer untersucht werden.

AMA Committee on Hearing and Equilibrium. Guide for the Evaluation of Hearing Handicap. JAMA 1979; 241:2055-2059.

Armstrong C, Lillie RD. Experimental lymphocytic choriomeningitis of monkeys and mice produced by a virus encountered in studies of the 1933 St. Louis encephalitis epidemic. Publ Health Rep 1934; 49:1019-1927.

Baize S, Kaplon J, Faure C, Pannetier D, Georges-Courbot MC, Deubel V. Lassa virus infection of human dendritic cells and macrophages is productive but fails to activate cells. J Immunol 2004; 172:2861-2869.

Barber GN, Clegg JC, Lloyd G. Expression of the Lassa virus nucleocapsid protein in insect cells infected with a recombinant baculovirus: application to diagnostic assays for Lassa virus infection. J Gen Virol 1990; 71:19-28.

Bausch DG, Demby AH, Coulibaly M, Kanu J, Goba A, Bah A, Conde N, Wurtzel HL, Cavallaro KF, Lloyd E, Baldet FB, Cisse SD, Fofona D, Savane IK, Tolno RT, Mahy B, Wagoner KD, Ksiazek TG, Peters CJ, Rollin PE. Lassa fever in Guinea: I. Epidemiology of human disease and clinical observations. Vector Borne Zoonotic Dis 2001; 1: 283-297.

Berrocal JR, Ramirez-Camacho R. Sudden sensorineural hearing loss: supporting the immunologic theory. Ann Otol Rhinol Laryngol 2002; 111:989-97.

Bausch DG, Rollin PE, Demby AH, Coulibaly M, Kanu J, Conteh AS, Wagoner KD, McMullan LK, Bowen MD, Peters CJ, Ksiazek TG. Diagnosis and clinical virology of Lassa fever as evaluated by enzyme-linked immunosorbent assay, indirect fluorescent-antibody test, and virus isolation. J Clin Microbiol 2000; 38:2670-7.

Buchmeier MJ, Bowen MD, Peters CJ. Arenaviridae: The viruses and their replication. In: Knipe DM, Howley PM, ed. (4th Edition) Fields virology. Philadelphia: Lippincott-Raven, 2001:1635–1668.

Cadoni G, Fetoni AR, Agostino S, De Santis A, Manna R, Ottaviani F, Paludetti G. Autoimmunity in sudden sensorineural hearing loss: possible role of anti-endothelial cell autoantibodies. *Acta Otolaryngol Suppl* 2002; 548:30-3.

Cao W, Henry MD, Borrow P, Yamada H, Elder JH, Ravkov EV, Nichol ST, Compans RW, Campbell KP, Oldstone MB. Identification of alpha-dystroglycan as a receptor for lymphocytic choriomeningitis virus and Lassa fever virus. *Science* 1998; 282:2079-2081.

Cazals Y. Auditory sensori-neural alterations induced by salicylate. *Prog Neurobiol* 2000; 62: 583-631.

Centers for Disease Control and Prevention. Viral Hemorrhagic Fevers: Fact Sheets Lassa Fever 2002.

Ciuffetti G, Scardazza A, Serafini G, Lombardini R, Mannarino E, Simoncelli C. Whole-blood filterability in sudden deafness. *Laryngoscope* 1991; 101: 65-67.

Cummins D, Bennett D, Fisher-Hoch SP, Farrar B, McCormick JB. Electrocardiographic abnormalities in patients with Lassa fever. *J Trop Med Hyg* 1989a; 92: 350-355.

Cummins D, Fisher-Hoch SP, Walshe KJ, Mackie IJ, McCormick JB, Bennett D, Perez G, Farrar B, Machin SJ. A plasma inhibitor of platelet aggregation in patients with Lassa fever. *Br J Haematol* 1989b; 72:543-548.

Cummins D, McCormick JB, Bennett D, Samba JA, Farrar B, Machin SJ, Fisher-Hoch SP. Acute sensorineural deafness in Lassa fever. JAMA (United States) 1990; 264:2093-2096.

Demby AH, Chamberlain J, Brown DW, Clegg CS. Early diagnosis of Lassa fever by reverse transcription-PCR. J Clin Microbiol 1994; 32:2898-2903.

Demby AH, Inapogui A, Kargbo K, Koninga J, Kourouma K, Kanu J, Coulibaly M, Wagoner KD, Ksiazek TG, Peters CJ, Rollin PE, Bausch DG. Lassa fever in Guinea: II. Distribution and prevalence of Lassa virus infection in small mammals. Vector Borne Zoonotic Dis 2001; 1:283-97.

Drosten C, Kummerer BM, Schmitz H, Gunther S. Molecular diagnostics of viral hemorrhagic fevers. Antiviral Res 2003; 57:61-87.

Fetterman BL, Luxford WM, Saunders JE. Sudden bilateral sensorineural hearing loss. Laryngoscope 1996; 106:1347-1350.

Fisher-Hoch SP, Hutwagner L, Brown B, McCormick JB. Effective Vaccine for Lassa Fever. Journal of Virology 2000; 74:6777-6783.

Fisher-Hoch SP, McCormick JB. Lassa fever vaccine. Expert Rev Vaccines 2004; 3:189-197.

Fisher-Hoch SP, McCormick JB, Sasso D, Craven RB. Hematologic dysfunction in Lassa fever. J Med Virol 1988; 26:127-135.

Fisher-Hoch SP, McCormick JB. Towards a human Lassa fever vaccine. Rev Med Virol 2001; 11:331-341.

Fisher-Hoch SP, Price ME, Craven RB, Price FM, Forthall DN, Sasso DR, Scott SM, McCormick JB. Safe intensive-care management of a severe case of Lassa fever with simple barrier nursing techniques. *Lancet* 1985; 2:1227-1229.

Fisher-Hoch SP, Tomori O, Nasidi A, Perez-Oronoz GI, Fakile Y, Hutwagner L, McCormick JB. Review of cases of nosocomial Lassa fever in Nigeria: the high price of poor medical practice. *BMJ* 1995; 311:857-859.

Fleischer K, Kohler B, Kirchner A, Schmid J. Lassa-Fieber. *Med Klein (München)* 2000; 95: 340-345.

Frame JD, Baldwin JM Jr, Gocke DJ, Troup JM. Lassa fever, a new virus disease of man from West Africa. I. Clinical description and pathological findings. *Am J Trop Med Hyg* 1970; 19:670-676.

Garcia-Berrocal JR, Ramirez-Camacho R, Millan I, Gorriz C, Trinidad A, Arellano B, Lobo D. Sudden presentation of immune-mediated inner ear disease: characterization and acceptance of a cochleovestibular dysfunction. *J Laryngol Otol* 2003 Oct; 117:775-779.

Geisbert TW, Jones S, Fritz EA, Shurtleff AC, Geisbert JB, Liebscher R, Grolla A, Stroher U, Fernando L, Daddario KM, Guttieri MC, Mothe BR, Larsen T, Hensley LE, Jahrling PB, Feldmann H. Development of a new vaccine for the prevention of Lassa fever. *PLoS Med* 2005 Jun; 2(6):e183.

Gunther S, Lenz O. Lassa virus. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2004; 41:339-90. Review.

Gunther S, Weisner B, Roth A, Grewing T, Asper M, Drosten C, Emmerich P, Petersen J, Wilczek M, Schmitz H. Lassa fever encephalopathy: Lassa virus in cerebrospinal fluid but not in serum. *J Infect Dis* 2001; 184(3):345-9.

Hall JW, Antonelli PJ. Assessment of Peripheral and Central Auditory Function. In: Bailey BG, ed. (3rd Edition) Head and Neck Surgery-Otolaryngology. Philadelphia: Lippinkott-Raven, 2001:1601-1672.

Holborow C. Prevention of deafness in rural tropical areas. Trop Doct 1985; 15: 39-41.

Holborow C, Martinson F, Anger N. A study of deafness in West Africa. Int J Pediatr Otorhinolaryngol 1982; 4:107-132.

Hufert FT, Ludke W, Schmitz H. Epitope mapping of the Lassa virus nucleoprotein using monoclonal anti-nucleocapsid antibodies. Arch Virol 1989; 106:201-12.

Jaffe BF. Viral causes of sudden inner ear deafness. Otolaryngol Clin North Am 1978; 11:63-69.

Jahrling PB, Frame JD, Rhoderick JB, Monson MH. Endemic Lassa fever in Liberia. IV. Selection of optimally effective plasma for treatment by passive immunization. Trans R Soc Trop Med Hyg 1985a; 79:380-384.

Jahrling PB, Frame JD, Smith SB, Monson MH. Endemic Lassa fever in Liberia. III. Characterization of Lassa virus isolates. Trans R Soc Trop Med Hyg 1985b; 79:374-379.

Jahrling PB, Peters CJ. Serology and virulence diversity among Old-World arenaviruses, and the relevance to vaccine development. Med Microbiol Immunol (Berl) 1986; 175:165-167.

Johnson KM, Elliott LH, Heymann DL. Preparation of polyvalent viral immunofluorescent intracellular antigens and use in human serosurveys. J Clin Microbiol 1981; 14:527-529.

Johnson KM, McCormick JB, Webb PA, Smith ES, Elliott LH, King IJ. Clinical virology of Lassa fever in hospitalized patients. *J Infect Dis* 1987; 155:456-464.

Kamperschroer C, Quinn DG. Quantification of epitope-specific MHC class-II-restricted T cells following lymphocytic choriomeningitis virus infection. *Cell Immunol* 1999; 193:134-146.

Koc A, Sanisoglu O. Sudden sensorineural hearing loss: literature survey on recent studies. *J Otolaryngol* 2003; 32:308-313.

Liao BS, Byl FM, Adour KK. Audiometric comparison of Lassa fever hearing loss and idiopathic sudden hearing loss: evidence for viral cause. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1992; 106:226-229.

Lüllmann H, Mohr K. Antiinfektiöse Wirkstoffe. In: Lüllmann M, Mohr K, ed. *Pharmakologie und Toxikologie* (14. Auflage). Stuttgart: Thieme Verlag, 1999:392-451.

Lukashevich IS, Clegg JCS, Sidibe K. Lassa Virus Activity in Guinea: Distribution of Human Antiviral Antibody Defined Using Enzyme-Linked Immunosorbent Assay With Recombinant Antigen. *Journal of Medical Virology* 1993; 40:210-217.

Lukashevich IS, Maryankova R, Vladyko AS, Nashkevich N, Koleda S, Djavani M, Horejsh D, Voitenok NN, Salvato MS. Lassa and Mopeia virus replication in human monocytes/macrophages and in endothelial cells: different effects on IL-8 and TNF-alpha gene expression. *J Med Virol* 1999; 59:552-560.

Marzo SJ. Intratympanic Steroid Perfusion for Sudden Sensorineural Hearing loss. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2005; 131:730-732.

McCormick JB, Fisher-Hoch SP. Lassa fever. *Curr Top Microbiol Immunol* 2002; 262:75-109.

McCormick JB, King IF, Webb PA. Lassa fever-effective therapy with ribavirin. *N Engl J Med* 1986; 304:20-26.

McCormick JB, King IJ, Webb PA, Johnson KM, O'Sullivan R, Smith ES, Trippel S, Tong TC. A case-control study of the clinical diagnosis and course of Lassa fever. *J Infect Dis* 1987a; 155: 445-455.

McCormick JB, Webb PA, Krebs JW, Johnson KM, Smith ES. A prospective study of the epidemiology and ecology of Lassa fever. *J Infect Dis* 1987b; 155:437-444.

McCormick JB. Clinical, epidemiologic, and therapeutic aspects of Lassa fever. *Med Microbiol Immunol* 1996; 175:153-155.

Mertens PE, Patton R, Baum JJ, Monath TP. Clinical presentation of Lassa fever cases during the hospital epidemic at Zorzor, Liberia, March-April 1972. *Am J Trop Med Hyg* 1973; 22:780-784.

Monath TP. Lassa fever: review of epidemiology and epizootiology. *Bull World Health Organisation* 1975; 52:577-592.

Monath TP, Maher M, Casals J, Kissling RE, Cacciapuoti A. Lassa fever in the Eastern Province of Sierra Leone, 1970-1972. II. Clinical observations and virological studies on selected hospital cases. *Am J Trop Med Hyg* 1974; 23:1140-1149.

Moskowitz D, Lee KJ, Smith HW. Steroid use in idiopathic sudden sensorineural hearing loss. *Laryngoscope* 1984; 94:664-6.

Niklasson BS, Jahrling PB, Peters CJ. Detection of Lassa virus antigens and Lassa virus-specific immunoglobulins G and M by enzyme-linked immunosorbent assay. J Clin Microbiol 1984; 20:239-44.

Northern JL, Downs MP. Medical aspects of hearing loss. In: Hearing in Children 4th ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1991:61-96.

Pannetier D, Faure C, Georges-Courbot MC, Deubel V, Baize S. Human macrophages, but not dendritic cells, are activated and produce alpha/beta interferons in response to Mopeia virus infection. J Virol 2004; 78:10516-10524.

Rambukkana A, Kunz S, Min J, Campbell KP, Oldstone MB. Targeting Schwann cells by nonlytic arenaviral infection selectively inhibits myelination. Proc Natl Acad Sci U S A 2003; 100(26):16071-6.

Roche RJ, Silamut K, Pukrittayakamee S, Looareesuwan S, Molunto P, Boonamrung S, White NJ. Quinine induces reversible high-tone hearing loss. Br J Clin Pharmacol 1990; 29:780-782.

Roeser RJ, Buckley KA, Stickney GS. Pure Tone Tests. In: Roeser, Valente, Hosford-Dunn eds. Audiology: Diagnosis. New York: Thieme medical Publishers, 2000:227-251.

Rybak LP. Pathophysiology of furosemide ototoxicity. J Otolaryngol 1982; 11:127-133.

Rybak LP. Deafness associated with Lassa fever. JAMA 1990; 264:2119.

Salvato M, Shimomaye, E Oldstone MB. The primary structure of the lymphocytic choriomeningitis virus L gene encodes a putative RNA polymerase. Virology 1989; 169:377-384.

Sando I, Loehr A, Harada T, Sobel JH. Sudden deafness: histopathologic correlation in temporal bone. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1977; 96:269-279.

Scherer SS, Arroyo EJ. Recent progress on the molecular organization of myelinated axons. *J Peripher Nerv Syst* 2002; 7:1-12.

Schmitz H, Kohler B, Laue T, Drosten C, Veldkamp PJ, Gunther S, Emmerich P, Geisen HP, Fleischer K, Beersma MF, Hoerauf A. Monitoring of clinical and laboratory data in two cases of imported Lassa fever. *Microbes Infect* 2000; 4:43-50.

Schuknecht HF, Donovan ED. The pathology of idiopathic sudden sensorineural hearing loss. *Arch Otorhinolaryngol* 1986; 243:1-15.

Seely DR, Gloyd SS, Wright AD, Norton SJ. Hearing loss prevalence and risk factors among Sierra Leonean children. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1995; 121:853-858.

Slattery WH, Fisher LM, Iqbal Z, Liu N. Oral steroid regimens for idiopathic sudden sensorineural hearing loss. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2005; 132:5-10.

Stephenson EH, Larson EW, Dominik JW. Effect of environmental factors on aerosol-induced Lassa virus infection. *J Med Virol* 1984; 14:295-303.

ter Meulen J. Lassa fever: implications of T-cell immunity for vaccine development. *J Biotechnol* 1999; 73:207-212.

ter Meulen J. Response to haemorrhagic fevers in Europe. *Lancet* 2000; 356 Suppl:s64.

ter Meulen J, Badusche M, Kuhnt K, Doetze A, Satoguina J, Marti T, Loeliger C, Koulemou K, Koivogui L, Schmitz H, Fleischer B, Hoerauf A. Characterisation of Human CD4+ T-Cell Clones Recognizing Conserved and Variable Epitopes of the Lassa Virus Nucleoprotein. *Journal of Virology* 2000; 74:2186-2192.

ter Meulen J, Badusche M, Satoguina J, Strecker T, Lenz O, Loeliger C, Sakho M, Koulemou K, Koivogui L, Hoerauf A. Old and New World arenaviruses share a highly conserved epitope in the fusion domain of the glycoprotein 2, which is recognized by Lassa virus-specific human CD4+ T-cell clones. *Virology* 2004; 321:134-43.

ter Meulen J, Koulemou K, Wittekindt T, Windisch K, Strigl S, Conde S, Schmitz H. Detection of Lassa Virus Antinucleoprotein Immunoglobulin G (IgG) and IgM Antibodies by Simple recombinant Immuniblos assay for field Use. *Journal of Clinical Microbiology* 1998; 36:3143-3148.

ter Meulen J, Lenz O, Koivogui L, Magassouba N, Kaushik SK, Lewis R, Aldis W. Short communication: Lassa fever in Sierra Leone: UN peacekeepers are at risk. *Trop Med Int Health* 2001; 6:83-84.

ter Meulen J, Lukashevich I, Sidibe K, Inapogui A, Marx M, Dorlemann A, Yansane ML, Koulemou K, Chang-Claude J, Schmitz H. Hunting of peridomestic rodents and consumption of their meat as possible risk factors for rodent-to-human transmission of Lassa virus in the Republic of Guinea. *Am J Trop Med Hyg* 1996; 55:661-666.

Tomori O, Fabiyi A, Sorungbe A, Smith A, McCormick JB. Viral hemorrhagic fever antibodies in Nigerian populations. *Am J Trop Med Hyg* 1988; 38:407-410.

Tomori O, Johnson KM, Kiley MP, Elliott LH. Standardization of a plaque assay for Lassa virus. *J Med Virol* 1987; 22:77-89.

Veltri RW, Wilson WR, Sprinkle PM, Rodman SM, Kavesh DA. The implication of viruses in idiopathic sudden hearing loss: primary infection or reactivation of latent viruses? *Otolaryngol Head Neck Surg* 1981; 89:137-141.

Vuori M, Lahikainen EA, Peltonen T. Perceptive deafness in connection with mumps: a study of 298 servicemen suffering from mumps. *Acta otolaryngol* 1962; 55:231-236.

Walker DH, McCormick JB, Johnson KM, Webb PA, Komba-Kono G, Elliott LH, Gardner JJ. Pathologic and virologic study of fatal Lassa fever in man. *Am J Pathol* 1982; 107:349-356.

Westerberg BD, Skowronski DM, Stewart IF, Stewart L, Bernauer M, Mudarikwa L. Prevalence of hearing loss in primary school children in Zimbabwe. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2005; 69:517-25.

White HA. Lassa fever. A study of 23 hospital cases. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1972 ; 66:390-401.

Wilson J. Hearing impairment in developing countries. *J Otolaryngol* 1990; 19:368-371.

Wilson WR, Veltri RW, Laird N, Sprinkle PM. Viral and epidemiologic studies of idiopathic sudden hearing loss. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1983; 91:653-658.

Wilson WR, Byl FM, Laird N. The efficacy of steroids in the treatment of idiopathic sudden hearing loss: a double-blind clinical study. *Arch Otolaryngol* 1980; 106:772-776.

World Health Organisation. Report of the Informal Working Group on Prevention of Deafness and Hearing Impairment Programme Planning. Publication PDH/91.1; Geneva 1991.

World Health Organisation. WHO Lassa fact sheet No 179, 2000.

World Health Organisation. Facts about deafness, 2002.

(<http://www.who.int/pbd/deafness/facts/en/>)

World Health Organisation. Immunization Profile – Guinea, 2005.

(www.who.int/immunization_monitoring/en/globalsummary/CountryProfileResult.cfm)

Wulff H, Lange JV. Indirect immunofluorescence for the diagnosis of Lassa fever infection. Bull World Health Organ 1975; 52:429-436.

Yoon TH, Paparella MM, Schachern PA, Alleva M. Histopathology of sudden hearing loss. Laryngoscope 1990; 100:707-715.

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

BCG	Bacille-Calmette-Guérin (Tubekulose-Impfstoff)
BSA	Bovines Serumalbumin
BSL4	Bio safety level 4
dBHL	Dezibel Hearing Level
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
Elispot	Enzyme-linked immunospot
FITC	Fluoresceinisothyocyanat
GP-C	Lassavirus Glykoprotein precursor
GP-1	Lassavirus Glykoprotein 1
GP-2	Lassavirus Glykoprotein 2
HLA	human leukocyte antigens (Histokompatibilitätsantigene)
Hz	Hertz
Ig	Immunglobulin
IFN-gamma	Interferon-gamma
IIF	Indirekte Immunfluoreszenz
NP	Lassavirus Nukleoprotein
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PBS	Phosphate buffered saline
PFHG	Projet de Recherche sur les Fièvres Hémorragiques en Guinée
PHA	Phytohämagglutinin
PP	Lassavirus Glykoprotein-Peptid-Pool
PPD	Purified Protein Derivative (Tuberkuline)
PTA	Pure Tone Average (mittlere Hörschwelle)
RT-PCR	reverse-transcription-polymerase-chain-reaction
SNHL	sensorineural hearing loss (sensorineurale Schwerhörigkeit)
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
YFV	yellow fever-virus (17D Gelbfieberimpfvirus)

7.2 Fragebogen

FICHE D'ENQUETE (Lassa – Surdité)

N 

Prénoms Nom Sexe : M ☐ ... F ☐
Age(année)..... Profession..... District.....
Village/Secteur..... Sous-Préfecture..... Préfecture.....
S/C.....

Est-ce que la surdité est apparue pendant une maladie febrile : Oui ☐ Non ☐

Si oui : Date approximative..... Durée de la maladie.....

Si oui, à quel moment? ☐ Au cours de la maladie ☐ Après la maladie

Est-ce la surdité était: ☐ temporaire ☐ permanente

Son installation a été: ☐ brutale ☐ progressive

Le degré de surdité est : ☐ léger ☐ partiel

Est-ce que vous avez eu plusieurs attaques d'une maladie fébrile suivi par une surdité ?

Oui ☐ Non ☐

La maladie était-elle grave ? Oui ☐ Non ☐

Si oui précisez les signes :

☐ Fièvres fortes ☐ Céphalées ☐ Myalgies ☐ Dysphagies ☐ Toux

☐ Conjonctivite ☐ Douleurs retro sternale ☐ Oed mes faciaux

☐ Hémorragies/ Saignements

Avez vous eu de contact avec des rats, ses excréments où avez vous mangé des rats
avant le début de la maladie ? Oui ☐ Non ☐

Examen physique

T°C Pouls Respiration TA

Peau

Muqueuses

Aire ganglionnaire

Appareil broncho-pulmonaire

.....

Appareil cardio-vasculaire

.....

Appareil digestif

.....

Signes Neurologiques

☐ Vertiges ☐ Convulsions ☐ Réflexes de BabinskyRéflexes rotuliens Oui ☐ Non ☐Réflexes palpébral Oui ☐ Non ☐**Examen d'Oreille****1-Aspect du pavillon** : Normal ☐ Anormal ☐

Si anormal :

décrivez

.....

2- Otoscopie :a - Conduit auditif externe : Normal ☐ Rétrécis ☐ Bouché ☐Présence du cérumen : Oui ☐ Non ☐ Si Oui localisez : OD ☐ OG ☐Présence du pus : Oui ☐ Non ☐ Si Oui localisez : OD ☐ OG ☐

b - Etat du tympan :

- tympan droit : Normal ☐ Perforé ☐- tympan gauche : Normal ☐ Perforé ☐**3- Rinne** : Négatif ☐ Egal ☐ Positif ☐**4- Weber** : égal ☐ latéralisé à droite ☐ latéralisé à gauche ☐**Antécédent du malade :**Avez vous fait des traitements ? Oui ☐ Non ☐

Si oui quel médicament avez-vous

utilisé ?

7.3 Abbildungen

Abb. 1a/b Studiengebiet



1a Guinea



1b Untersuchungsgebiet
Bouramaya
(eingekreist)

(modifiziert nach Maggellan GeografixSM, 1992)

Abb. 2a/b/c Universitätsklinik Donka in Conakry



a: Vor dem Labor des „Projet de Recherche sur les Fièvres Hémorragiques en Guinée“



b: warten Probanden auf die Blutentnahme und bekommen von Dr. Sylla Medikamente.

c: Blutentnahmen im Labor des PFHG



Abb. 3 Dr. Oumar Sylla bei der audiometrischen Diagnostik



7.4 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren

Bhakdi, Dietz, Fischer, Huppmann, Kirkpatrick, Leube, Löffelholz, Müller-Esterl, Römer, Schmidt, Schönhense, Vaupel, Vollrath in Mainz,
sowie die Damen und Herren Foerster, Gaedicke, Heuser, Knauf, Kreutz, Marx, Maxeiner, Mitznegg, Rüden, Scherer, Schneider, Stein, Weber in Berlin.

7.5 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Jan ter Meulen für die thematische Anregung der vorliegenden Arbeit und für die ausgezeichnete Betreuung während deren Durchführung. Er stand stets als Ansprechpartner zu Verfügung und unterstützte mich beim Erstellen der Arbeit.

Herrn Professor Achim Hörauf danke ich für die freundliche Aufnahme in die Abteilung für Parasitologie am Hamburger Bernhard-Nocht-Institut, die Überlassung des Laborplatzes und die ausgezeichnete Betreuung.

Frau Marlis Badusche möchte ich herzlich für die geduldige und fachlich kompetente Einweisung in die Labortechniken sowie für die Betreuung und Unterstützung während der Experimente danken.

Dr. Lamine Koivogui und seinen Mitarbeitern (Projet de Recherche sur les Fièvres Hémorragiques en Guinée) möchte ich für die hilfsbereite Zusammenarbeit und das angenehme, stets produktive, Arbeitsklima bei der Durchführung der Arbeiten in Guinea danken. Besonderer Dank geht an Dr. Oumar Sylla für die Durchführung der audiometrischen Untersuchungen.

Herrn Dr. Bohlender, Klinik für Audiologie und Phoniatrie der Charité Campus Benjamin Franklin, danke ich für die freundliche Unterstützung bei meinen Fragen zur Auswertung der Audiometriedaten.

Herrn Dr. G.-J. Weverling, Crucell Holland B.V., danke ich für statistische Beratung.

Nicht zuletzt bin ich meinen Eltern zu größtem Dank verpflichtet. Sie haben mich in jeder Hinsicht unterstützt und es mir ermöglicht, den Weg bis hierher zu gehen.

Die Studie wurde durch Drittmittel des Howard Hughes Medical Institute, USA, und der Europäischen Gemeinschaft finanziert.